

**NEM-VÉLETLEN TENDENCIÁK NÉHÁNY
EVOLÚCIÓS MEGNYILVÁNULÁSA ÉS
BIOTECHNOLÓGIAI HASZNÁLHATÓSÁGA**

SOÓS JÓZSEF

DOKTORI DISSZERTÁCIÓ

**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
SZEGED**

2000.

TARTALOM

BEVEZETÉS.....	3
IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ	6
SPINPOLARIZÁCIÓ OPTIKAILAG AKTIV MOLEKULÁKBAN.....	12
AMINOSAV OPTIKAI IZOMEREK ELVÁLASZTÁSA.....	15
KORMEGHATÁROZÁS AMINOSAV RACEMIZÁCIÓS ADATOK ALAPJÁN.....	20
AMINOSAVAK NEM-VÉLETLEN ELOSZLÁSA TERMÁLIS PEPTIDEKBEN.....	27
A MÉRÉSTECHNIKA NÉHÁNY RÉSZLETE	33
<i>Anizotrópia faktor</i>	33
<i>Szabadalmaztatott megoldás lineáris dikroizmus (LD) mérésére</i>	33
AMINOSAVSORRENDBŐL LEVEZETHETŐ NEM-VÉLETLEN TENDENCIÁK NÉHÁNY FEHÉRJÉBEN.....	37
FEHÉRJÉK SZERKEZETBECSLÉSE AMINOSAV-SZEKVENCIÁK ALAPJÁN (SZABÁLYSZERŰSÉGEK SZERKEZETBECSLÉSRE)	40
FEHÉRJE MÁSODLAGOS SZERKEZET MEGHATÁROZÁS MEMBRÁN SZUSZPENZIÓKBAN CIRKULÁRIS DIKROIZMUS SPEKTRUM ALAPJÁN	50
BIOTECHNOLÓGIAI ALKALMAZÁSOK	55
D-AMINOSAVAK BEÉPÍTÉSE PEPTID-TERMÉSZETŰ HATÓANYAGOKBA	55
BIOSZENZOR MORFINSZERŰ VEGYÜLETEK KVANTITATÍV VIZSGÁLATÁRA	56
ENKEFALIN-ANALÓGOK (D-AMINOSAV ²) QSAR-VIZSGÁLATA	57
BIOLÓGIALAG AKTÍV FEHÉRJESZEGMENSEK AZONOSÍTÁSA	59
<i>HIV-1 gp41 immunkémia</i>	59
<i>Az első peptid alapú HIV-1 teszt</i>	61
<i>„Idegesítő” peptid a laminin szerkezetében</i>	61
ÖSSZEFOGLALÁS.....	63
SUMMARY	67
SOME NON-RANDOM TENDENCIES IN (PRE)BIOLOGICAL EVOLUTIONARY PROCESSES AND THEIR USEABILITY IN BIOTECHNOLOGY	67
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	71
IRODALOM	72
MELLÉKLET	77

BEVEZETÉS

DISSZERTÁCIÓM A MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA, SZEGEDI
BIOLÓGIAI KÖZPONTJA BIOFIZIKAI INTÉZETÉBEN VÉGZETT MUNKÁIM, ILLETVE
FINN-ANGOL-SZLOVÁK KOOPERÁCIÓBAN PUBLIKÁLT EREDMÉNYEK ALAPJÁN KÉSZÜLT.

Több mint 140 év telt el azóta, hogy Pasteur felfedezte az élő és élettelen közötti egyik leglényegesebb elválasztó vonalat: a tükörszimmetria sérülését az élő organizmusokban. Gondolhatnánk, hogy az eltelt hosszú idő elegendő kellett legyen a különbség eredetének felderítésére, ám ez nem így van. Az eddigi mérleg sok-sok lehetséges hipotézis és kevés meggyőző adat. Jelen dolgozatban rövid összefoglalás után a címnek és tartalomjegyzéknek megfelelően válogatott fejezetek találhatóak, amelyekhez saját kísérletek, illetve gondolatok és ezekhez fűződő eredmények kapcsolódnak.

A szimmetriasértés lényege, hogy az élő szervezetek az aminosavak és cukrok két lehetséges optikai izomeréből jellemzően csak az egyiket építik be: a fehérjék L-aminosavakat, a nukleinsavak D-cukrokat tartalmaznak. Az egyik alapkérdés tehát az, hogyan választotta ki a természet az egyik izomert, hogy aztán az életet erre építse?

A királis, enantiomer, vagy másképpen optikai izomer molekula-párok szimmetria szempontjából úgy viszonyulnak egymáshoz, mint a jobb és bal kezünk. Az élettelen természetben a lehetséges optikai izomerek egyenlő arányban (racém keverékként) fordulnak elő, míg az élő anyagok optikailag tiszták, tehát az egyik izomer egyedül fordul elő. Az optikai tisztaság az élet alapvető feltétele és megkülönböztető tulajdonsága, ami a genetikai kód mellett közös minden földi élő szervezetben. Az élet keletkezésére vonatkozó elméleteknek szükségképpen ki kell térniük az optikai tisztaság eredetére. Két irányzatból az egyik a mainak megfelelő, királisan tiszta szervezetek evolúciós előnyeit feltételezi az ellentétesen királis társaikkal szemben, míg a másik a prebiológiai evolúció alatt (teljesen azonos általános paraméterekkel bíró izomer-párokat feltételezve) fizikai-kémiai kölcsönhatásokkal tolja el az egyensúlyt a mai élőkre is jellemző aszimmetria irányába. Irodalmi adatok és saját kísérletek, tapasztalatok alapján foglalunk össze idevágó ismereteket.

A biotechnológia ezen a szinten több ponton jöhet képbe. Nem természetes, D-aminosavakat találtak daganatokban, öregedéssel kapcsoltan és egyes szembetegségekben, hosszú ideig tartó anyagcserezavarok kapcsán, aminek vizsgálata diagnosztikai értékű lehet, illetve a problémák hátterében álló mechanizmusok tisztázását segítheti. Az élő szervezetek enzimeket működtetnek nem-természetes izomerek eltávolítására. A biológiai anyagok elpusztulva az élettelen természet szabályszerűségeinek megfelelően, többek között olyan átalakulásokon mennek át, amelyek a szimmetrikus struktúrák irányába, végül (racém) egyensúlyba vezetnek. Fossziliák aminosav-racemizációs adatai kormeghatározást, illetve un. paleotemperatúra adatok meghatározását teszi lehetővé. Az egyik legnagyobb jelentőségű irány, amikor természetes, pl. biológiailag aktív peptideket módosítunk nem-természetes aminosavakkal a biológiai aktivitás jellegének, stabilitásának, hatáserősségének módosítása céljából. A szerkezet-hatás összefüggések vizsgálata egyes esetekben kétirányú következtetéseket engednek: a hatóanyag szerkezetének javítását a kívánt hatás(ok) optimálisabbá tételére illetve indirekt módon a kötőhely (receptor) jellegének leírását, ha a teszteket, hatáserősség méréseket különböző modelleken végezzük. Az itt felsoroltakat irodalmi és saját kísérletileg igazolt példákkal illusztráljuk.

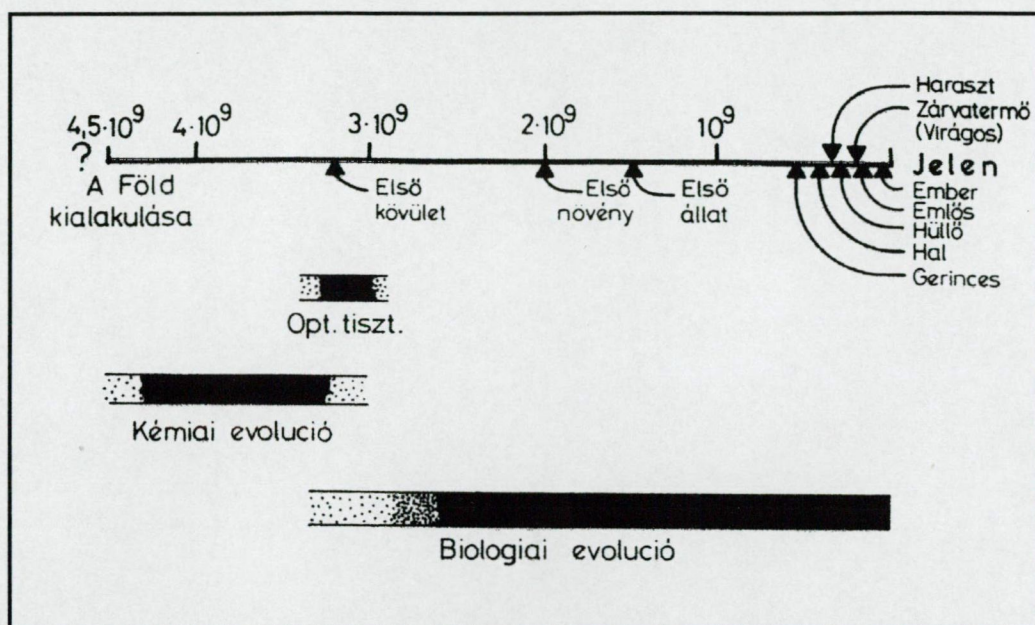
Az evolúció kémiai szakasza kis, szimmetrikus molekulákból (H_2 , NH_3 , CH_4 , CO , H_2O , stb.) különböző formában adott energia (fény, elektromos, hő, stb.) felhasználásával létrehozta azokat a szimmetrikus kismolekulákat és aszimmetrikus vegyületek racém formáit, amelyekkel a prebiológiai evolúció elindulhatott. A biológiai evolúció bevezető szakaszában a ribonukleinsavak különösen fontos szerepet játszhattak, mert az információtároláson túl bizonyos katalitikus hatással is bírtak. A további fejlődésben azok a kialakult sejtszerű struktúrák lehettek kedvezményezettek, amelyekben zsírszerű anyagokkal fázisok szeparálódása valósult meg és amelyekben információtároló nukleinsavak, szerkezeti szerepeket betöltő és enzimhatású fehérjék egyaránt előfordultak. Modell kísérleteket végeztünk, hogy kimutathatóak-e nem-véletlen tendenciák, ha irodalomban elfogadott, prebiotikus körülmények között állítunk elő peptideket. Néhány témára jobban fókuszálunk, de kitérünk egy-két mérés technikai hozzájárulásra is, ami pontosabb eredményekre vezethet (pl. anizotrópia faktor és hasonló), illetve elemi struktúrák rendezettségi viszonyait segíti megismerni (lineáris dikroizmus spektrométer szabadalom).

Egy másik lehetséges megközelítéssel a mai élővilágot alkotó anyagok vizsgálatából deduktív úton juthatunk szabályszerűséghez. A fehérjék nagy része az elsődleges szerkezet szintjén ismert, az aminosav szekvenciákat különböző adatbázisokban meg lehet találni. Magasabb szintű struktúrák visszavezetése az elsődleges szerkezetre, az itt megnyilvánuló szabályszerűségek felismerése hozzájárul evolúcióval kapcsolt ismereteinkhez. Ugyanezen ismeretek biotechnológiai aspektusa, amikor immunológiai aktív helyeket ismerünk fel, pl. diagnosztikai célra, vagy biológiailag aktív molekulákat tervezünk/módosítunk és állítunk elő, amelyek egyébként esetleg nem is léteznek a természetben, de szerencsés esetben megjósolhatjuk, hogyan fognak hatni. Vannak esetek, amikor más szerkezetvizsgálati módszerek, pl. röntgendiffrakció nem, vagy csak korlátozottan használhatóak, pl. a legtöbb membránfehérje esetében, amelyek kristályosítása gyakorlatilag egyenként kidolgozandó, fáradságos és időigényes. Kísérleti munkák munkahipotézisei felállításához több-kevesebb sikerrel modellek szerkeszthetők az adatbázisokból elvonatkoztatott szabályok számítógépi alkalmazásával. Ez a terület ma már széles körben művelt, jelen dolgozatban saját aktivitásom köré csoportosított példákkal illusztrálom.

IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

Nagyon valószínű, hogy néhány fényéven belül mi vagyunk az egyetlen fejlett technológiai civilizáció {1}, de életnyomokat közelebb is lehet találni. A földön kívüli élettől kapcsolatos kutatások összefoglaló elnevezéseként az exobiológia elnevezés használatos, amelyet a földi élővilág kifejlődését megelőző és bevezető szakaszának kutatására általánosítanak. Ma (2000-ben) az Amerikai Űrhajózási Hivatal (NASA), Asztrobiológiai Központot is üzemeltet {2}, ahol főként a biológia kombinálódik a csillagászzal, természetesen más tudományokkal egyetemben. Céljuk az élet eredetének, evolúciójának és univerzumi előfordulásának kutatása, megértése, illetve jobb megértése.

A földi életre vonatkozó leegyszerűsített lehetséges sor: a periódusos rendszer elemeinek evolúciója után egyszerű vegyületek jöttek létre a kozmikus térben (a későbbi élet szempontjából fontos szénhidrogének, cianidok és származékaik, stb.), amit a Föld kialakulása alatt a szilárd felszín, redukáló atmoszféra és hidroszféra létrejötte követ. A Föld felületén a kezdeti széntartalmú vegyületek egyre összetettebb szerves struktúrákat formálnak, monomereket és egyszerűbb polimereket, létrejön az ún. ősleves. Ezen ősleves alkotóinak „önformálódása” hoz létre polimolekuláris nyílt rendszereket, amelyek bizonyos mértékben képesek a környezeti változásokhoz való alkalmazkodásra és bírnak a növekedés – szaporodás képességével. Az Oparin-elmélet szerint polipeptidek, zsírszerű vegyületek, polinukleotidok külön-külön és párban is létrehozhattak a környezetüktől fázishatárral elkülönülő struktúrákat, ún. koacervátumokat, de a fejlődés során azok a rendszerek voltak kedvezményezettek, amelyek fehérjéket (végrehajtás és szerkezet), nukleinsavakat (információtárolás) és lipideket (membránképzés) egyaránt tartalmaztak. A létrejött probionták további fejlődése egyre tökéletesebb anyagcseréjű, tökéletesebb molekuláris és szuper-molekuláris struktúrájú rendszereket hozott létre, amelyek prebiológiai kiválogatódása eredményeképpen jelentek meg az első organizmusok. A vázolt logikai menet sok szempontból igazoltnak látszik {3}, természetesen sok-sok megválaszolatlan kérdéssel a háttérben.



1. ábra: Evolúciós időrend

A Föld kb. 4.6 milliárd éves, míg a legöregebb mikrofosszíliákat Dél-Afrikában találták és 3.6 milliárd évesnek határozták (1. ábra). Ilyen korú kőzetekből mutattak ki előre jellemzőnek tartott izoprenoidokat, szteránokat, porfirineket, aminosavakat és cukrokat. Rádiócsillagászati módszerekkel a csillagközi térben is (az aminosavak szintjéig) kimutatott egyszerű szerves vegyületekből {4} a földkéreg kialakulását követő kb. 200-500 millió éven belül jelent meg a földi élet őse és ezt követte a napjainkban is tartó biológiai evolúció. A prebiotikus tényezők (redukáló légkör, ősleves, stb.) napjainkra megfordíthatatlanul megváltoztak, így ezeknek becslése csak indirekt úton lehetséges. 1954-ben az ún. Miller-kísérletekben igazolták először, hogy a feltételezett őslégkörnek megfelelő atmoszférában (CH_4 , NH_3 , H_2O , H_2) elektromos kisülésre aminosavakat kaptak és később más szerves savakat is azonosítottak. Az energiafajtákat változtatva (pl. hő, fény, radioaktív sugárzás) hasonló termékek keletkeznek. Más esetekben az őslégkörből levezethető, de az adott kísérletben elkülönített anyagokon végeztek vizsgálatokat. Néhány kiragadott példa: ciánhidrogénből kiindulva adenint, rodanidokból metionint, paraformaldehid és hidroxilamin elegyből szerint tudtak előállítani. Publikációkból levonható a következtetés, hogy az élőben előforduló anyagok összes alaptípusa levezethető prebiotikus körülményeket modellezve {5, 6, 7}. Fontos, hogy az adott körülmények között többnyire a mai élőben megtalálható vegyületek jönnek létre, annak ellenére, hogy sokkal több fajtájú termék lenne levezethető formálisan.

A kémiai evolúció, a modellkísérletek tanúsága szerint szimmetrikus termékeket produkált, azaz a lehetséges optikai izomerek ekvimolekuláris keverékét. Ha a mai élőket vizsgáljuk teljes aszimmetriát találunk: nukleinsavakban D-cukrokat, fehérjékben L-aminosavakat. Az könnyen belátható, hogy az optikailag tiszta rendszerek a racémhez képest előnyösebbek (nagyobb polimerizáció sebesség, oldékonyság, stb.), de miért nincsenek tükörképi élőlények, amelyek tehát L-cukrokat és D-aminosavakat tartalmaznak? Ha csak azt vesszük figyelembe, hogy az optikai izomer párok tagjai, a szimmetria eltérésen túl, mindenben azonos tulajdonságúak, akkor a mai élő szervezetekhez viszonyítva tükörképi élőlényeknek is azonos valószínűséggel kellene előfordulniuk.

Homokirális szerkezet az önreprodukció szükséges feltétele {8}. Modell-rendszerben D-cukrokat tartalmazó, 5 pár adenin (A) – timin (T) komplementerből álló kettős hélixet formálhatunk. Ha a középső, harmadik T-t L-cukrot tartalmazó tükörképi párjára cseréljük, akkor a „hibás” T-nukleotid primidingyűrűje a normális pozícióhoz képest kb. 100° -kal elcsavarodik, ami teljesen kizárja, hogy a hibás A-T bázispárban a hidrogénkötés létrejöjjön, azaz egy ilyen DNS-szakasz nem másolható. A legprimitívebb önreprodukáló rendszer kialakulásának királis közegben lehetett nagyobb esélye, tehát az általános szimmetriasérülésnek legvalószínűbben az evolúció prebiológiai szakaszában kellett megtörténnie, ráadásul viszonylag gyorsan. Bizonyított tény, hogy izotróp térben akirális keverékből a két izomer képződési valószínűsége azonos és királis molekulák nem ekvimolekuláris keveréke idővel racémmé alakul. A racemizáció az a sztereokémiai folyamat, amelynek során az optikai izomerek egymásba alakulnak, és amely az élettelen természet szimmetriáját fenntartja. A racemizáció a szimmetriasértés ellenében hat és az esetleges különbséget idővel elmosza, ha az aszimmetriát okozó hatás csak időszakosan érvényesül, vagy mértéke kicsi. Aminosavakat véve példaként, 25°C -on a racemizációs idő (év) alaninra $1.2 \cdot 10^4$, aszparaginsavra $3.5 \cdot 10^3$, fenilalaninra $2 \cdot 10^3$. Deracemizáció csak olyan folyamatok jelenlétében képzelhető el, amelyek a racemizációnál gyorsabban és hatékonyabban működnek. Könnyen lehet, hogy az életnek néhány ezer évnél gyorsabban kellett kialakulnia (esetleg 6 nap alatt?).

Az ún. „előny faktor” (AF-advantage factor) elmélet gyakorlatilag Pasteur óta létezik (részleteiben természetesen bővülő módon), amely szerint a tükörképi párok reakciósebességei nem egyeznek meg egy aszimmetrikus hatás jelenléte miatt és

ez a különbség meghatározó szerepet játszott a kémiai evolúció során a szimmetriasértés létrejöttében. Kétféle „előny faktort” különböztetnek meg, amelyek közül *lokális* (a Föld különböző helyein eltérő erővel, meghatározott ideig ható) tényezők: a cirkulárisan poláros fény, a statikus elektromos és mágneses tér, a Coriolis erő és ezek kombinációi. A *globális* „előny faktorok” a gyenge kölcsönhatás aszimmetriája miatt jönnek létre, és pl. a β -sugárzás spinpolarizáltságában, illetve az izomerek kissé különböző energiaállapotában nyilvánulnak meg. Az előny faktor mértékét az ún. g-faktorral ($\Delta E/kT$) jellemzik.

Szinergetikai meggondolás szerint a termikus fluktuációkon kívül nem kell más kezdeti aszimmetriát feltételezni az ősracém összetételében, mert egy pillanatnyi koncentráció különbség autokatalitikus folyamatban felerősödhet és idővel teljes optikai tisztasághoz vezethet (az izomerek közötti kölcsönhatás erősen sztereoselektív, amely pozitív visszacsatolást eredményez). Lehetséges, hogy a kritikus pont előtti aszimmetriát valamelyik „előny faktor” hozta létre, de akkor ennek olyan mértékűnek kellett lennie, amit a statisztikus fluktuáció nem tudott elmosni az élet kialakulásáig. Matematikailag van esélye annak, hogy véletlenek vezettek ahhoz a királis katasztrófához, aminek praktikus eredménye a Földi élet mai aszimmetriája. Valódi bizonyíték(ok)ra e témában csak néhány tíz év múlva lehet számítani, amikor Földön kívüli mintákban esetleg tükörképi életnyomokra is akadnak, mert véletlenek révén ennek is létre kell jönnie egy nagyobb térben.

F. Crick „irányított pánspermia” elmélete a korábbiakhoz képest a folyamatok egy részét a világűrbe helyezi (alapul Arrhenius, a feledés homályából feltámasztott gondolatai szolgáltak). Realitását többek között az adja, hogy a prebiológiai evolúció (kis molekulák létrejöttétől az önreprodukáló szervezetek létrejöttéig) valószínű időtartama 200 millió év, vagy még kevesebb lehetett, ami meglehetősen rövidnek tűnik, ha minden lényeges lépést a Földön megtörténtnek feltételezünk, pedig az űrben is kimutattak, pl. aminosav oligomereket.

Goldanszki elmélete {9} a mélyhőmérsékleti kémiai folyamatok kvantáltságából indul. Eszerint az űrben gázból és porból álló felhők léteznek, amelyben a porrészecskék aránya 1% körül van, és amelyek magját szilícium és grafit alkotja. A porszemek felületét ún. piszkos jég borítja, CO , NH_3 , H_2O , HCN , stb. tartalommal. Ezekből gyakorlatilag bármely szerves vegyület létrejöhet az űrben jelenlévő nagy hatótávolságú protonok, kemény ultraibolya és γ -sugárzás hatására.

A felhő gravitációs instabilitása kifejlődését követően az anyag differenciálódik, porfelhővel körülvett protocsillag alakul. A porfelhőből bolygók jöhetnek létre, amelyekre a bolygók kialakulása során folyamatosan, vagy utána felületi adszorpcióval juthattak a gáz-porfelhőben létrejött szerves vegyületek (ez a valószínűbb), amelyek nyersanyagként szolgálhattak az ősseves kialakulásához. A hipotézissel az űrbeli alacsony hőmérséklet és említett sugárzások révén („előny faktor”) a szerves kiindulási anyagok kezdeti aszimmetriája is levezethető.

Az optikailag tiszta rendszerek előnye a racémekkel szemben egyértelmű és bizonyított (nagyobb polimerizáció sebesség, jobb oldékonyság, stb.), ha az élők szempontjából vizsgálódunk {10}. A mai élők makromolekuláinak helicitása a monomerek szimmetria sajátágaiból következik. Az optikai tisztaság fenntartása energiaigényes folyamat. Egy magára hagyott optikailag tiszta anyag racemizálódik. Az élők különböző mechanizmusokat működtetnek a nem-természetes izomerek eltávolítására.

A negyvenes években Kogl és Erxleben mutattak ki D-aminosavakat tumorokban oly módon, hogy normál és daganatos májat etettek kutyákkal. A tumorokban előforduló, nem-természetes, D-glutaminsavat a kutyák felhasználni nem tudták és így vizeletükben ürítették, lehetővé téve a szelektív analízist a szerzőknek. Fisher {11} és munkatársai 1995-ben végeztek újabb vizsgálatokat e területen D-aszparaginsavat és D-glutaminsavat keresve tumor-fehérjékben. Megerősítették a nem-természetes aminosavak jelenlétét, de nem találtak szignifikáns különbséget a kontroll illetve daganatos szövetek között, sőt D-aszparaginsav vonatkozásában az egészségesnek mondott szövetek mutattak valamelyes többletet a tumoros szövetekhez viszonyítva. A kérdést célszerű lenne tovább vizsgálni jobban körülírt feltételekkel, mert glutaminsavra az esetek felében 1.4-től 5.6-ig terjedő D-aminosav felesleget írtak le tumorok felében és statisztikailag nagy a bizonytalanság.

Imai és munkatársai {12} különböző gerincesek szöveteiben és testfolyadékokban vizsgálták D-aminosavak jelenlétét. Az agy és perifériális szervek fejlődésének korai szakaszában D-aszparaginsavat találtak és agyban a D-szerin receptor moduláló szerepét is valószínűsítik. Emberi vérérumban a D-szerin és D-alanin jelenlétét vesefunkciók tönkremenetelével hozzák összefüggésbe.

D-szerin, D-aszparaginsav és az összes-D-aminosav tartalmat (95%-os valószínűséggel) magasabbnak találták Alzheimer-kórban szenvedő betegek kamrai agyfolyadékáiban, egészséges kontrollokhoz viszonyítva {13}. A D-aminosav többletet degeneratív folyamatokkal hozzák összefüggésbe. Szivacsos agysorvadásban a degeneráció valószínűleg nem jár mérhető D-aszparaginsav felszaporodással {14},

Vörösvértestek öregedésével összefüggésben szintén találtak növekvő mennyiségű D-aszparaginsavat β -metilészter formában {15, 16}. A kapcsolódó technika {17} alkalmasnak tűnik nagyon alacsony D-aminosavtartalom (elsősorban glutaminsav, aszparaginsav) meghatározására is, mivel a legtöbb egyéb, analitikai célú származékképzés bizonyos fokú racemizációt okoz és torzítja az eredményt (ld. később). Ez korrekciót igényel és a lehetséges hibák miatt a megbízható kimutathatóság limitált. A D-aszpartil-fehérje-karboxil-metiltransferázzal kíméletes, szelektív reakció áll rendelkezésre.

Nagyon érdekes megfigyelés {18}, hogy idős (átlagban 80 éves) emberi szemlencsék crystallinjának α A-alegységén belül a 151-es pozícióban található aszparaginsav sokkal nagyobb mértékben fordul elő D-formában, mint várható volna. Különleges királis teret tételeznek fel az ASP-151 körül és sztereoinverziós mechanizmust az átalakulásra. $\frac{D}{L}(\text{ASP}^{151}) = 5.7$ aránnyal jellemzett α A-crystallint denaturáltak, aminek eredményeképpen a magasabb rendű szerkezettel a feltételezett királis tér is összeomlott, és a $\frac{D}{L}(\text{ASP}^{151})$ arány gyorsan 2.17 (kezelés 70 °C-on) és 1.21 (6 M karbamid jelenlétében) értékekre állt. Ez a mechanizmus a fehérjekémia és biokémia új területét nyithatja meg pl. az öregedési folyamatok tanulmányozásában, illetve e konkrét esetben a szürke hályog kialakulására vonatkozóan.

SPINPOLARIZÁCIÓ OPTIKAILAG AKTIV MOLEKULÁKBAN

Pozitron annihilációs vizsgálatokban aminosav optikai izomerekre azt találták, hogy a triplet pozitronium képzés valószínűsége a D-izomerekben nagyobb, mint párjaikban {19}. Szinglet pozitroniumban a pozitron - elektron spinek antiparallel, triplet pozitroniumban pedig parallel állnak. Mivel a pozitronok (a paritás-sértés miatt) mozgásiránnyal párhuzamosan spinpolarizáltak, a fentiek alapján eltérő spinmegoszlás várható a D-, illetve L-izomerekben.

Az előzőek elméleti magyarázatára Hraskó Péter dolgozta ki az ún. helikális elektrongáz modellt {20}, mely szerint

$$n_+ - n_- = \frac{m\omega c}{\pi\hbar} 3\pi^2 n^{\frac{2}{3}}, \text{ ahol}$$

$$[n_+] = [n_-] = [n] \Rightarrow (\text{cm}^3)^{-1}$$

$$[m] \Rightarrow g \text{ (elektron tömeg)}$$

$$c = 3 \cdot 10^{10} \text{ cm/sec}$$

$$[\omega] \Rightarrow \text{dimenzió nélkül, az optikai antipódok közötti különbséget jellemzi}$$

$$[h] \Rightarrow g \cdot \text{cm}^2/\text{sec}$$

$$n_+ \Rightarrow \text{a pozitív helicitású elektronok sűrűsége (mozgásiránnyal párhuzamos spin állás)}$$

$$n_- \Rightarrow \text{a negatív helicitású elektronok sűrűsége (mozgásirányhoz képest antiparallel spin állás)}$$

$$n_+ + n_- = n \Rightarrow \text{totális elektronsűrűség}$$

$$\frac{mc}{\pi\hbar} = 1.294952 \cdot 10^{10}$$

$$wF(x) = \frac{k_1 - k_2}{2k_0}, \text{ ahol}$$

$$k_1 \text{ és } k_2 \Rightarrow \text{az optikai antipódokba ágyazott béta-bomló izotóp bomlási állandói}$$

$$k_0 \Rightarrow \text{bomlási állandó ugyanerre az izotópra, szimmetrikus környezetben}$$

$$F(x): \text{függvény, amely az izotópból kilépő elektronok energiájából eredő eltérést hivatott kompenzálni (1. táblázat).}$$

1. táblázat
Az F(x) függvény számított értéke néhány izotópra

IZOTÓP	E _{MAX} (MeV)	F(x)
² H	0.018	63671.340
¹⁴ C	0.156	871.931
³² P	1.710	15.425
³⁵ S	0.167	763.618
⁸² Br	0.450	119.472
¹³¹ I	0.608	71.165

Abban az izomerben, amelyben a bomlási állandó nagyobb értéknek adódik (k_1), mint a másik izomerben (k_2), a pozitív helicitású elektronok sűrűsége nagyobb, mint a negatív helicitású elektronoké ($w > 0$).

Kísérleteket végeztünk w értékének becslésére {21}. Béta-bomló ⁸²Br izotópot építettünk optikailag aktív molekulákba, majd meghatároztuk a bomlási valószínűséget ezekben a vegyületekben és kristályos KBr-ban.

- **(+)-p-bróm- α -feniletilamin és (-)-p-bróm- α -feniletilamin**

Norse gyártmányú anyagokat vákuumdesztillálással tisztítottuk. A ⁸²Br beépítése heterogén izotópcserével történt.

- **3,5-dibróm-L-tirozin és 3,5-dibróm-D-tirozin**

Merck gyártmányú L- és D-tirozinból állítottuk elő a fenti anyagokat, direkt brómozással. A ⁸²Br beépülést Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegen radiokromatográfiával ellenőriztük. (Halogénezett tirozin származékok elválasztására ekvibrálás nélkül alkalmas a következő puffer: citromsav = 14.1 g, NaCl = 14.0 g, NaOH = 8.0 g, cc. HCl = 4.0 ml, végtérfogat = 1 l).

- **K⁸²Br** A fenti formában szállította az Izotóp Intézet.

A minták tisztaságát UV-abszorpció és CD mérésekkel is ellenőriztük. A bomlási valószínűség meghatározása Philips gyártmányú γ -spektrométerrel történt, a ⁸²Br elektron kibocsátását követő γ -foton detektálása alapján. A spektrométer 40

mintahelyes automatikus mintaváltóval volt kapcsolva. Ezekben helyeztünk el szimmetrikusan kettő darab γ -sugárzó standardot, 6 $K^{82}Br$ mintát, a jelzett antipódokból pedig 3-3 mintát, erre a célra kialakított légmentesen záró teflon mintatartóban. A ^{82}Br által kibocsátott γ -fotonokat Berthold gyártmányú NaI(Tl) szcintillációs detektor érzékelte.

A mérési adatokra a háttér korrekció után exponenciális görbét illesztettünk a legkisebb négyzetek módszerével. A bomlási állandókat és az ezekből kiszámítható w értékeket az alábbi táblázatban foglaljuk össze (2. táblázat):

2. táblázat
Átlagos bomlási állandó és w értékek különböző optikai izomerekben

Minta	Bomlási állandó, $k [10^{-9} \text{ sec}^{-1}]$	$w [10^{-6}]$
(+)-p- ^{82}Br - α -feniletilamin	5425 ± 4	7 ± 4
(-)-p- ^{82}Br - α -feniletilamin	5416 ± 4	
3,5-di- ^{82}Br -L-tirozin	5424 ± 4	6 ± 4
3,5-di- ^{82}Br -D-tirozin	5416 ± 4	
$K^{82}Br$	5408 ± 4	

Kristályos $K^{82}Br$ -ban a ^{82}Br felezési idejét 35.61 ± 0.02 órának határoztuk meg, ami a közzététel idején a legpontosabb adat volt. A kísérleti eredmények értékelése alapján w felső értékére tudunk becslést adni:

$w \leq 1.5 \cdot 10^{-5}.$

A p-bróm-feniletilaminban a vegyérték elektronok száma 45.

$n = 1.364 \cdot 10^{24} \text{ e}^-/\text{cm}^3$	Molekula térfogat: $3.3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3$	$w \leq 1.5 \cdot 10^{-5}$
$n_+ = 7.047 \cdot 10^{23} \text{ e}^-/\text{cm}^3$	$n_+ = 51.68 \%$	<u>$\Delta \leq 3.36 \%$</u>
$n_- = 6.590 \cdot 10^{23} \text{ e}^-/\text{cm}^3$	$n_- = 48.32 \%$	

Következésképpen, ha optikailag aktív molekulákban van **spinpolarizáció**, akkor ennek mértéke $\leq 3.36 \%$.

AMINOSAV OPTIKAI IZOMEREK ELVÁLASZTÁSA

Ma már sok módszer ismert a címben jelzett feladat megoldására: folyadék-kromatográfiai (elsősorban HPLC, királis fázisokkal) és gázkromatográfiai (GC/GC-MS) technikák tekinthetők alapvetőnek. Itt **gázkromatográfias elválasztási módszereket ismertetünk**, mivel egy JEOL 20K GC állt rendelkezésünkre a gyakorlatban. A gázkromatográfia adta lehetőségek két csoportba sorolhatók:

- (1) Aszimmetrikus reagenssel teszünk különbséget a D- és L-izomer között. Ekkor az elválasztás optikailag inaktív töltetű oszlopon történik.
- (2) Optikailag aktív oszloptöltet alkalmazása leegyszerűsíti az anyag-előkészítést, és pontosabbá teszi az elválasztást.

Jellemzően N-trifluoroacetil-aminosav-észter származékok kerülnek oszlopra. Az (1) pontban ismertetettek szerint az észter valamely optikailag aktív alkohollal képzett terméket jelent (pl. 2-butil-, 2-oktil-észtert), míg a (2) ponthoz történő származékképzéshez egyszerű alkoholok (pl. metil-, n-butil- vagy i-propilalkohol) használhatók.

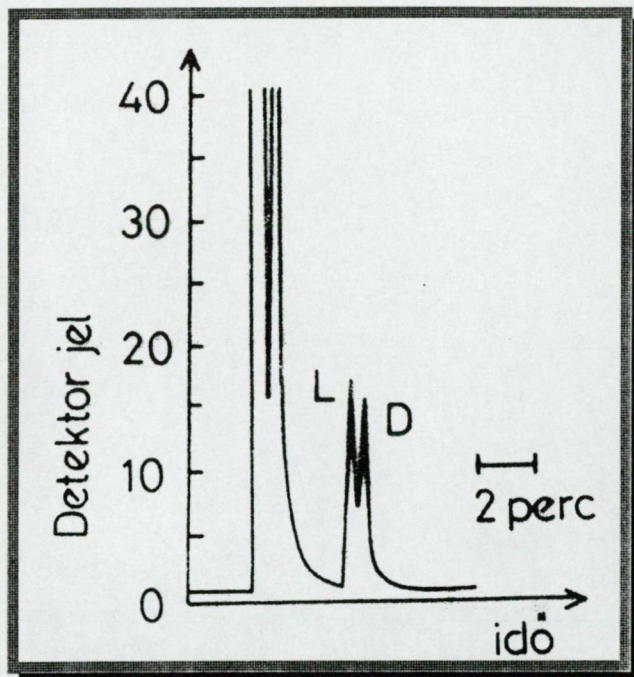
Alifás aminosavak (alanin, leucin, valin) optikai izomereit jó hatásfokkal választottuk el (3. táblázat és 2. ábra) szimmetrikus oszlopon, L-mentil-észterek formájában. Aminosavra számítva 50-szeres feleslegben 1.5 órán keresztül melegítettünk 120 °C-on L-mentolt, száraz sósav-gáz atmoszférában. A rendszert 110 °C-ra hűtve, 20 Hgmm-en távolítottuk el a visszamaradt mentolt, majd szobahőmérsékleten, a kiindulási aminosav mennyiségre számítva, 20-szoros feleslegben adtunk trifluorecetsavanhidridet az aminosav-L-mentilészter származékhoz. Az acetileződés néhány perc alatt végbement. Az elválasztás gázkromatográfias paraméterei a 2. ábrán láthatóak.

3. táblázat

N-trifluoroacetil-DL-aminosav-L-mentil-észterek enantiomerjeinek elválasztása

Aminosav	Retenciós idő (perc)		r _{LD}
Alanin	D	3.78	0.884
	L	3.34	
Leucin	D	3.74	0.882
	L	3.30	
Valin	D	2.78	0.885
	L	2.46	

1 nmol aminosav még izomereire választható ezzel a technikával.



2. ábra

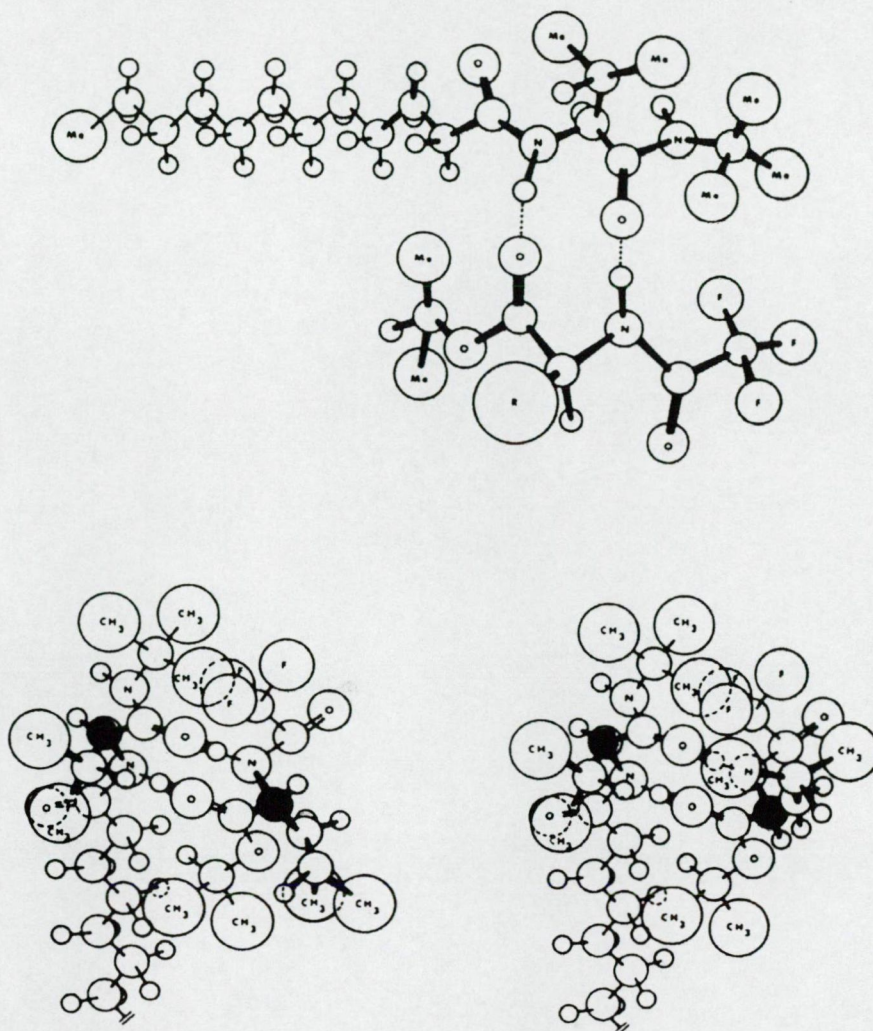
N-trifluoracetil-DL-alanin-L-mentilészter gázkromatogramja

Oszlophossz: 160 cm
Hordozó: GasChrom P, 100-120 mesh
Megosztó fázis: 15% EGSSX
Oszlop-hőmérséklet: 180 °C
N₂-vivőgáz-nyomás: 1 atm
Detektor: H₂-lángionizációs detektor
Gázkromatográf: JEOL 20K

Megjegyzendő, hogy a leírt rendszerben a különböző aminosavak izomerei meglehetősen átfedik egymást, ezért valamely aminosav elegyet analizálva, az optikai izomer arány meghatározása előtt az aminosavakat el kell választani egymástól.

Optikailag aktív töltetek alkalmazása az előzőekhez képest sok előnyt jelent. Ilyen megosztófázisok pl. az N-trifluoracetil-L-dipeptid-észterek, vagy az optikailag aktív diamidok. Az utóbbiak különösen jó hatásfokkal használhatók {22}. N-trifluoracetil-aminosav-metil- vagy i-propil-észterek vizsgálhatók ezeken az oszlopokon. Az egyes aminosavak és izomereik is elválnak rövid (2-4 m) töltelékes kolonnákon. Hasonló elválasztásokat végeztünk N-lauril-L-valil-t-butilamid (később LVBA) megosztó fázissal. Az L-aminosav–LVBA-komplex energetikailag stabilabb lévén: $r_{LD} > 1$ {23}, ahogy az a 3. ábrán is látható.

A munkát JEOL 20K gázkromatográfal végeztük (oszlop hőmérséklet = 110 °C, H₂ lángionizációs detektor, 10% LVBA megosztófázis 100/120 mesh Chromosorb WAW hordozón, üvegkolonna ID = 3 mm, N₂ vivőgáz). Az aminosavakat metil-, vagy izopropil-észter formában vizsgáltuk. Mint a 4. táblázatból látható, izopropil-észter használata javítja az izomer elválasztás jóságát.



D-aminosavszármazék-LVBA-komplex

L-aminosavszármazék-LVBA-komplex

3. ábra

Az N-lauril-L-valil-t-butilamid (LVBA) és a kialakuló komplex szerkezete: LVBA - N-trifluoroacetyl-aminosav-izopropilészter

Az O-észter előállítása száraz HCl gázzal telített metanollal, vagy izo-propilalkohollal történt. Az ebben felvett aminosav-mintát (1-5 mg/3 ml) 100 °C-on tartottuk 2 órát N₂ vagy argon atmoszférában. Ezután az oldószert bepárlással eltávolítva a mintához feleslegben (200 µl) adtunk trifluorecetsav-anhidridet (TFA). Az acetileződés szobahőmérsékleten néhány percen belül végbement. N₂ árammal távolítottuk el a TFA feleslegét. A mintákat éterben vagy diklórmetánban oldva kromatografáltuk (1 µg N-TFA-aminosav-észter / µl, 4. ábra).

4. táblázat
Alifás aminosav optikai izomerek gázkromatográfiája
N-lauril-L-valil-t-butilamid megosztó fázison

Aminosav	Izomer	t_R (perc) \pm SE	$r_{LD} \pm$ SE
Alanin-iP	D	13.8(1)	1.163(3)
	L	16.1(2)	
Valin-iP	D	21.4(1)	1.126(2)
	L	24.1(1)	
Glicin-iP		29.2(2)	
Leucin-Me	D	37.0	1.172
	L	43.4	
Serin-Me	D	37.6	1.064
	L	40.0	
Leucin-iP	D	52.7	1.217
	L	64.1	
nor-Leucin-iP	D	61.2	1.181
	L	71.3	

Rövidítések, jelmagyarázat:

- iP - izopropil-észter, Me - metil-észter
- t_R - retenciós idő (korrigált), $r_{LD} = t_R(L)/t_R(D)$, SE - standard hiba
- Az "Aminosav" N-TFA-aminosav-metil-, vagy izopropil-észtert jelent.
- A gázkromatográfiás paramétereket ld. a szövegben.

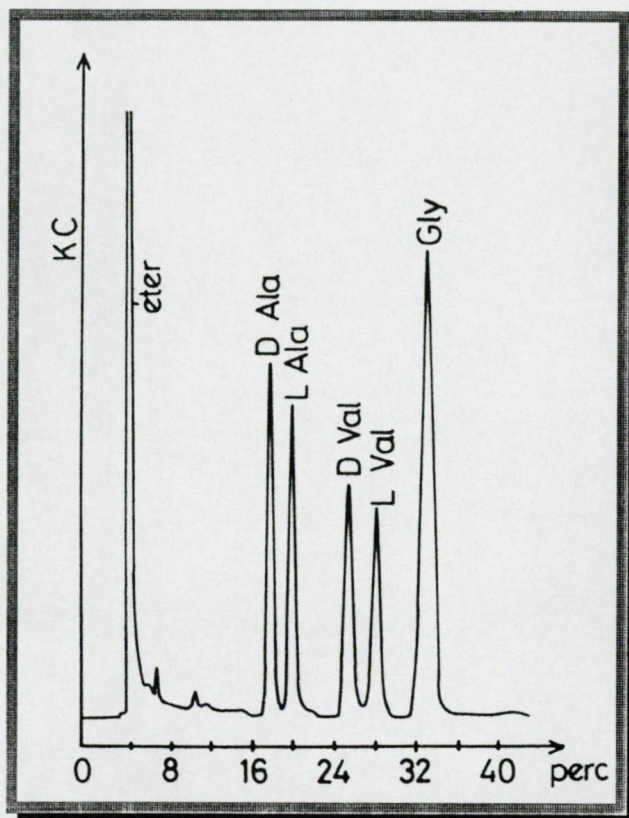
Alkalmas (elektronbefogási, vagy más néven ECD) detektorral nanogramm alatti aminosav mennyiségek is vizsgálhatók. Itt említem meg, hogy hasonló (diamid) típusú gázkromatográfiás megosztó fázist használtak az amerikai Viking-programban. Mivel az élet egyik alapvető jellemzője az optikai tisztaság, a marsi élet fontos bizonyítéka lett volna, ha aszimmetriát találnak az egyébként kimutatható aminosavak optikai aktivitását illetően. A kísérleti rendszer jól működött, de az eredmények negatívak, azaz nem találtak eredő optikai aktivitást. Meteoritokban található aminosavak Földön kívüli eredete lehetséges, de bizonyítani

nehéz a valószínű kontamináció miatt. 1996-ban McKay és munkatársai [Science **273**(1996)924] marsi élet nyomait gondolták bizonyítottnak az ALH84001 jelű mintában. Óvatosabb kísérletekkel, HPLC technikával, 1998-ban ugyanezen minta aminosavainak földi eredetét valószínűsítik újabban {24}

4. ábra

**N-TFA-aminosav-izopropil-észterek
gázkromatográfiája N-lauril-L-valil-
t-butilamid fázison.**

Gázkromatográf: JEOL 20K
Oszlop hőmérséklet = 110 °C
Detektor: H₂ lángionizációs
Megosztófázis: 10% LVBA
Hordozó: Chromosorb WAW (100/120)
Üvegkolonna, 2 m, ID = 3 mm
Vivőgáz: N₂
(Egyéb: a szövegben)

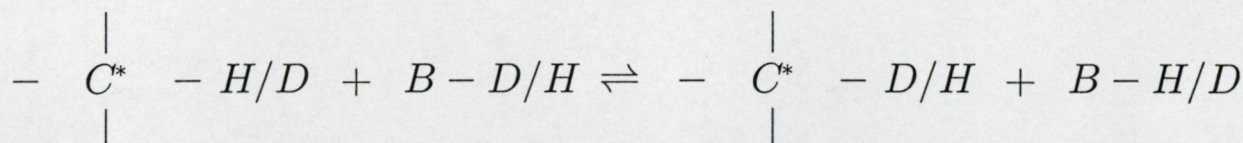


KORMEGHATÁROZÁS AMINOSAV RACEMIZÁCIÓS ADATOK ALAPJÁN

Az élő biológiai rendszerek jellemzően optikailag tiszták, L-aminosavakat és D-cukrokat tartalmaznak. Mivel az optikailag tiszta anyagokkal szemben a racémek termodinamikailag stabilabbak, az élők számára az optikai tisztaság fenntartása energiaigényes folyamat. Ha az élő elpusztul, megkezdődik az entrópia növekedés, az optikailag aktív anyagok racemizálódása, ami az egyensúlyi állandóval jellemezhető aránynál jut dinamikus egyensúlyba.

Aminosav racemizációs adatok alkalmasak lehetnek paleontológiai, paleoantropológiai leletek kormeghatározására az átlagos paleotemperatúra ismeretében, illetőleg ha más módszer szolgáltatja a kort, becsülhető az átlagos paleotemperatúra {25}. Modernebb alkalmazás, amikor igazságügyi orvostan területén használják a racemizációs adatokat {26}.

Egyszerű metodikáról van szó, amelynek alapjai az alábbiakban foglalhatók össze {részletesebben: Cram D, Fundamentals of Carbanoid Chemistry, 1965}. Az optikailag aktív karbonsavakból képződött karbanionok reakciói jól tanulmányozhatók proton-deutérium csere alapján:



Az előbbiektől szerinti izotópcseré sebességi állandója k_e , illetve a racemizáció sebességi állandója k_α .

A k_e/k_α arány alapján a reakciók négy csoportját különböztethetjük meg:

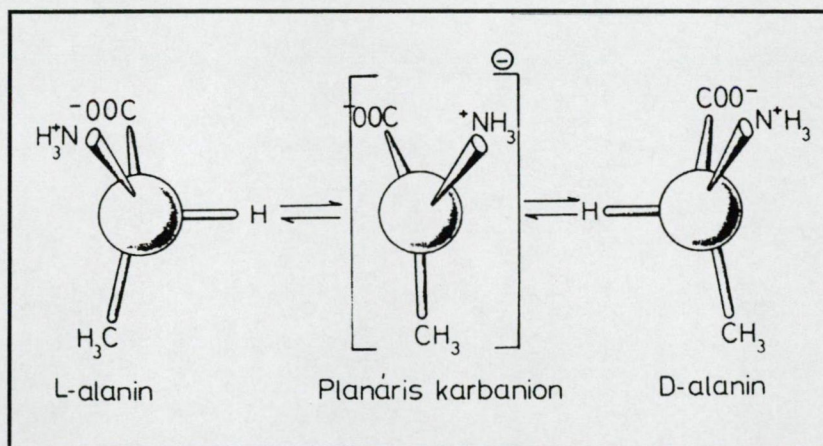
k_e/k_α arány	100%
∞	retenció
0.5	inverzió
1	racemizáció
0	izoracemizáció

Ha a csere teljes retencióval jelentkezik, az eredeti konfiguráció marad. Ha a csere komplett racemizációt eredményez, akkor minden karbanion előlről és

hátulról azonos valószínűséggel köthet protont. Ha a csere teljes inverzióval történik, minden karbanion a hátoldalon fog protont és invertált konfigurációt produkál. Mivel a termék optikailag aktív, de a kiindulási anyag optikai aktivitásával ellentett előjelű, abszolút értékben azonos forgatást mutat, a csere a racemizációra kapható érték felét adhatja, így k_e/k_α 0.5-hez tart. Ha a racemizáció csere nélkül jelentkezik izoracemizációról beszélünk. Ez utóbbi két úton valósulhat meg:

1. Intramolekuláris protontranszferrel, amikor megfelelően erős külső proton donor jelenlétében egy aszimmetrikus karbonsav szemközti oldaláról a hátoldalára bázis által hidrogén vihető át.
2. Intermolekuláris protontranszferrel (amely jobban rokon a közösleges racemizációs folyamattal), amikor az eredetileg a karbonsavval asszociált hidrogén reasszociálódik a karbanionokkal és racém anyagot formál izotópcsere nélkül.

Aminosavak esetén a karbanionok racemizációs reakcióban vesznek részt. Az alanin példáját láthatjuk a 5. ábrán.



5. ábra

Optikailag aktív alanin racemizációjának mechanizmusa

6 neutrális aminosav (ala, α -aminovajsav [avs], val, leu, phe, phe-gly) N-benzoilezett anilid-származékának báziskatalizált racemizációját vizsgálva a sebességi állandók összehasonlítása eredményeképpen a tesztelt aminosavak racemizációra való hajlama kifejezhető az α -szénatomon lévő alkil, aralkil vagy aril oldallánc elektronegativitásának viszonyában az α -proton savasságával.

A racemizációra való hajlam:

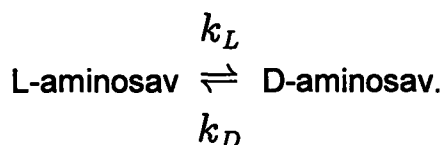
MOLEKULA	VAL	< AVS	< LEU	< ALA	< PHE	< PHE-GLY
R-csop.	i-propil	< etil	< i-butil	< metil	< fenil-CH ₂	< fenil

$$Ha \quad K = \frac{1}{t} \ln \frac{D_0}{D_t} = \frac{2.303}{t} \lg \frac{D_0}{D_t}, \quad akkor \quad \lg \frac{K}{K_{ala}} \quad \text{ábrázolása}$$

aminosavanként a Taft-féle szubsztituens polaritási állandóval szemben (σ^*) lineáris összefüggést ad [Chem. Pharm. Bull. **18**(9)(1970) 1794-1798]. D_0 = forgatás a $t = 0$ időpontban, míg D_t = a minta forgatása t időpontban.

A $2.2 \times \sigma^* = \lg \frac{K}{K_{ala}}$ összefüggésnek megfelelően az α -szubsztituens (R) elektronegativitásával kapcsolt racemizációs hajlam kifejezhető, kivéve, ha az α -szubsztituens sztérikus hatású. Ez utóbbit jelzi a valin (R = i-propil) esetében a $\lg \frac{K_{val}}{K_{ala}}$ és a σ_{val}^* által definiált pont eltérése a fenti egyenestől. Fontos kiemelni, hogy az R-szubsztituens az α -szénatomon, illetve bizonyos sztérikus gátlások befolyásolják a racemizációs paramétereket. Ezzel szemben egyes szerzők (pl. Bada JL) minden aminosavra azonos aktiválási energiát feltételeznek racemizációs reakciókban (ld. később).

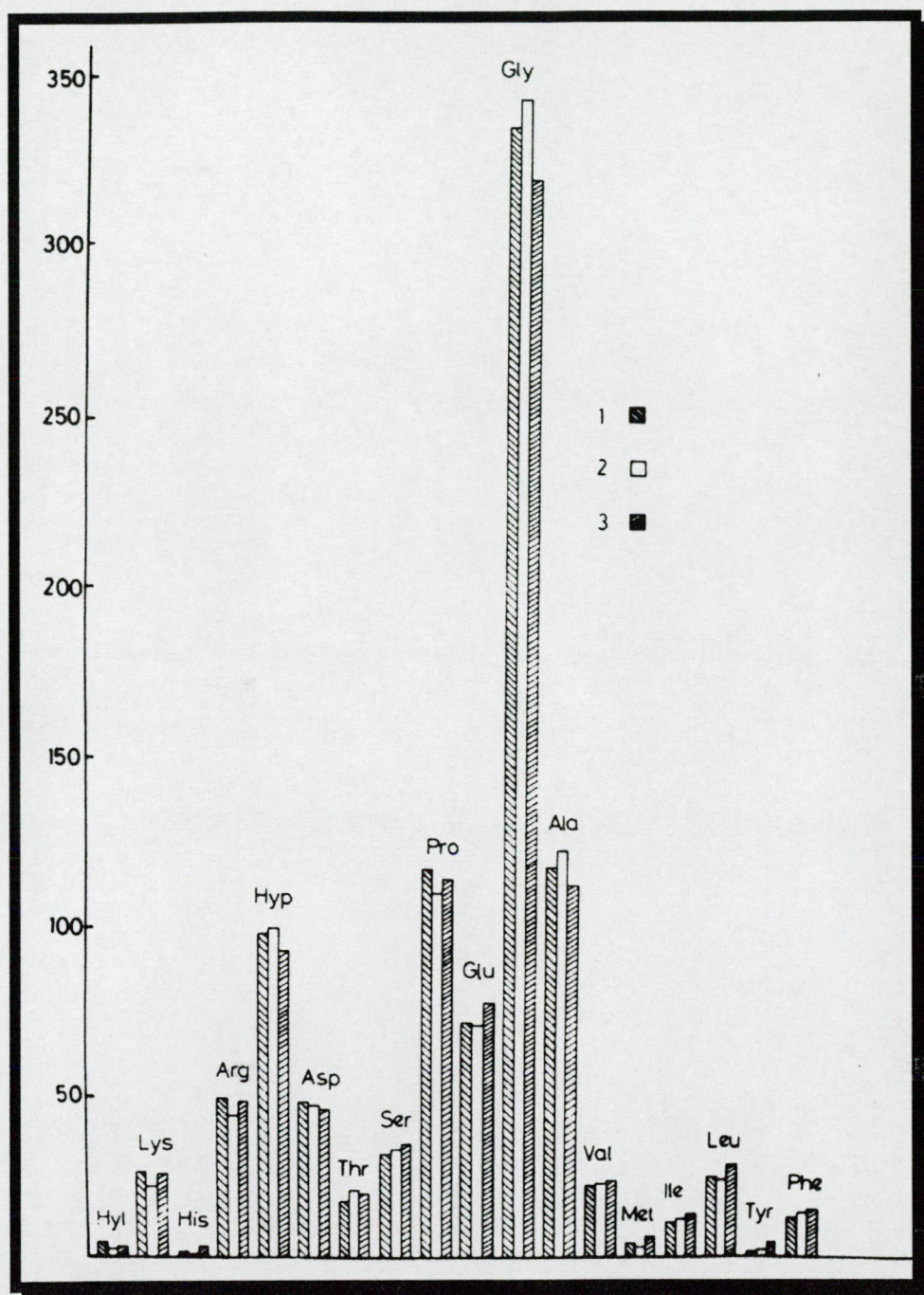
Tehát az aminosav racemizáció interkonverzióval történik úgy, hogy az optikailag tiszta aminosavak α -protonjainak leadásával keletkező planáris karbanionok proton felvétele L- és D-aminosavakat is szolgáltathat,



Egy aszimmetria centrumot tartalmazó aminosavaknál $k_L = k_D =$ elsőrendű sebességi állandó. Bada szerint {27} a peptid kötésben részt vevő aminosavak racemizációjának sebességi állandói nem térnek el számottevően a szabad aminosavak azonos értékeitől.

Recens és fosszilis csontok kollagénjeinek aminosav összetételét vizsgálva (6. ábra) azt találjuk, hogy minden aminosav - néhány százalékos ingadozással - azonosan degradálódik {28}.

Nem térünk ki a kollagén preparálás, hidrolízis és aminosav elválasztás lehetséges körülményeire. Az optikai izomer arány meghatározására jól használhatóak a gázkromatográfiás módszerek, amelyeket már ismertettünk az előző fejezetben.

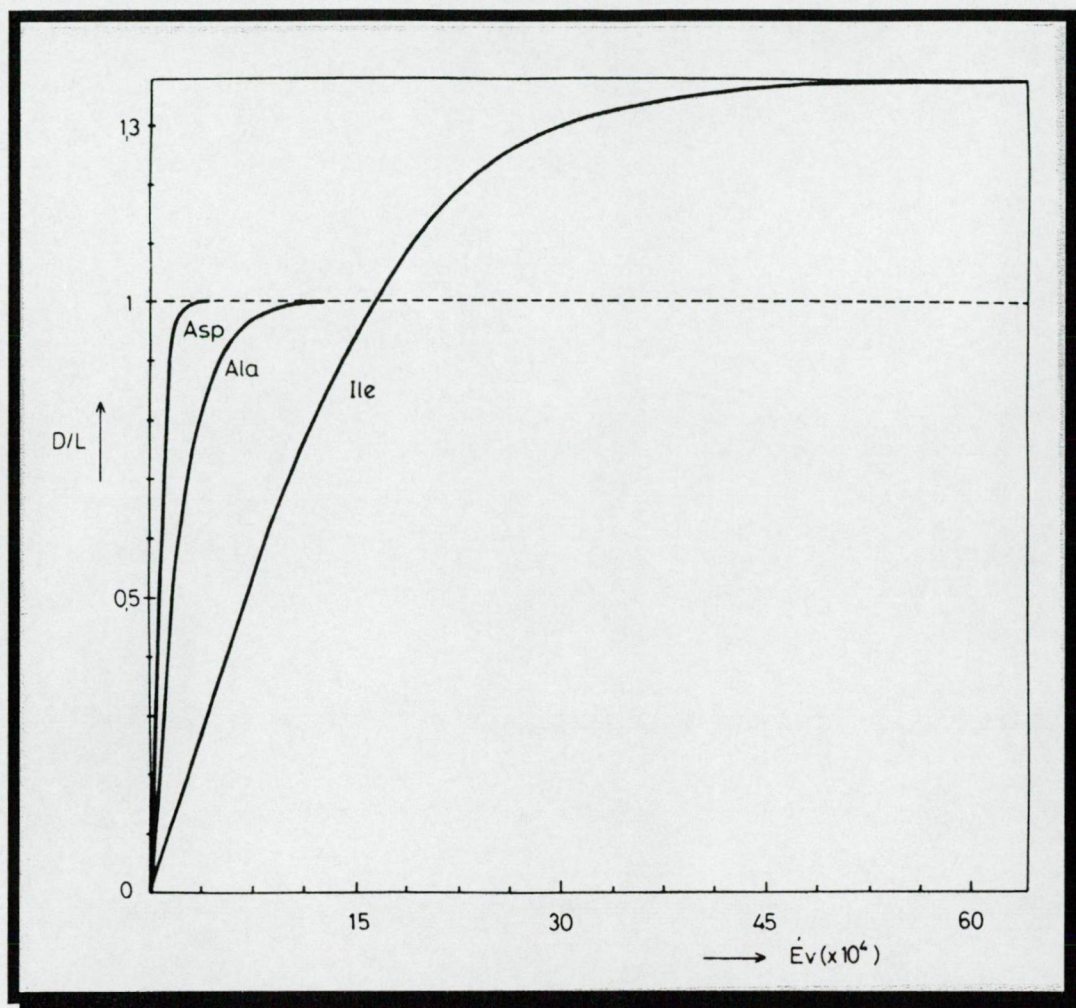


6. ábra

Aminosav eloszlás recens és fosszilis csontok kollagénjében
(azonos faj, 1000 rész szárazmaradék arányában feltüntetve)

1, 2 – Bison antiquus 3 – Bison bison

A várható kornak megfelelően kell kiválasztani az optikai aktivitás szempontjából
analizálandó aminosavat, vagy aminosavakat (7. ábra).



7. ábra
L-aminosavak optikai tisztaságának alakulása 25 °C-on,
az idő függvényében

Adott aminosavra vonatkozó optikai izomer arány a következőképpen
függ a reakciósebességi állandótól és az időtől (5. táblázat):

5. táblázat
Aminosav racemizációs adatok

Aminosav	k^{25} (év ⁻¹)	$\ln(A)$	E_a (kcal/mol)
Aszparaginsav	$9.795 \cdot 10^{-5}$	43.4481	31.2
Alanin	$2.857 \cdot 10^{-5}$	42.2159	
Izoleucin	$7.056 \cdot 10^{-6}$	40.8175	

k = elsőrendű sebességi állandó (25 °C), A = akciókonstans, E_a = aktiválási energia

$$\ln \frac{1 + \frac{D}{L}}{1 - K' \times \frac{D}{L}} - konstans = 1 + K' \times k \times t, \text{ ahol}$$

$\frac{D}{L}$ = enantiomer arány,

k = sebességi állandó,

t = idő,

$K' = \frac{1}{K_{\frac{D}{L}}}$, ahol $K_{\frac{D}{L}}$ az egyensúlyi állandó. (Egy aszimmetriacentrumos

molekulákra értéke 1. Az L-izoleucin racemizációja D-alloizoleucint produkál,

$K_{\frac{D}{L}} = 1.38$).

25 °C-tól való eltérés esetén vagy éppen paleotemperatúra

meghatározás esetén a számolást az Arrhenius-összefüggés alapján végezhetjük:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{R \times T}, \text{ ahol}$$

k = sebességi állandó

A = akciókonstans

E_a = aktiválási energia

R = egyetemes gázállandó

T = absz. hőmérséklet

Megjegyzendő, hogy rézionok jelenléte k értékét nagymértékben befolyásolhatja (növelheti).

Bada szerint az aminosav racemizáció alapján meghatározott korok $\pm 15\%$ -on belül egyeznek a minták C^{14} tartalmának mérésével nyert értékekkel.

J. L. Badától eltérően, más szerzők szerint bizonyos aminosavak esetében 1-3 Kcal/mól különbség van a racemizáció aktiválási energiájában. Ha ez igaz, akkor eltérő aktiválási energiájú aminosavakat vizsgálva ugyanazon mintában kijelölhetünk egy intervallumot (kor és hőmérséklet koordináta rendszerben), amelyen belül kell lennie a mintát jellemző kornak, illetve átlagos hőmérsékletnek:

$$\ln(t) = \ln \frac{-\ln(a)}{2k_0} + \frac{1}{R}, \quad a = \frac{[L] - [D]}{L + D}.$$

Ennek alkalmazása irodalmi adatokra [Bada JL, Nature **245**(1973)310] nem hozott használható eredményeket. Saját vizsgálatokat a JATE Antropológiai Tanszékéről kapott tarpai és zsákai temetőkből származó fosszilis és recens emberi csontanyagon végeztünk. Az előbbi formula itt sem működött, ami miatt valószínűbb,

hogy nincs számottevő különbség a különböző (csontokban fosszilizálódó) aminosavak racemizációja aktiválási energiájában. Biológiai objektumban „megöregedett”, onnan frissen, illetve ellenőrzött körülmények között kitermelt és tárolt mintákkal (fog, szemlencse, stb.) általában nincs probléma a feldolgozással (természetesen fog esetén jó zománc minta kell, mert dentin jelenléte meghamisítja, fiatalabbra maszkírozza az eredményt). Fosszilis csontok analízisének a környezeti tényezők alapos elemzését is magában kell foglalnia, mert pl. bizonyos agyagásványok (Na-montmorillit) jelenléte stabilizáló-fiatalító hatású, míg a réz jelenléte racemizáció-gyorsító, tehát a becsült kor szempontjából öregítő hatású.

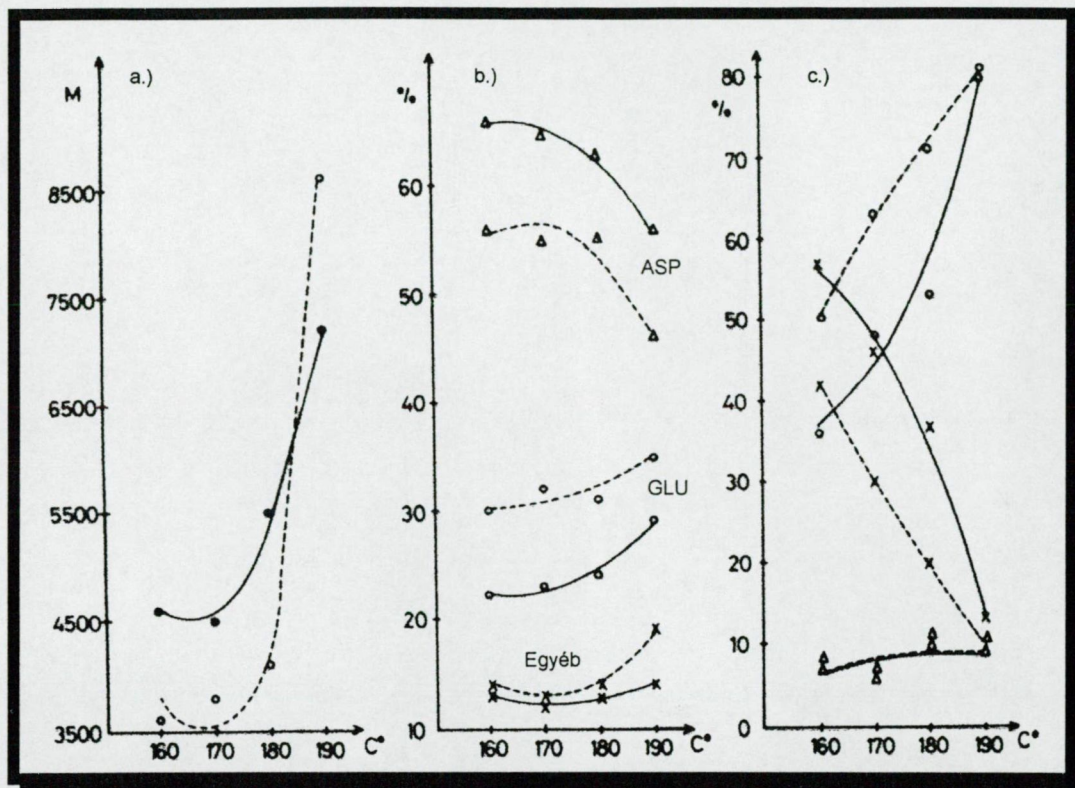
AMINOSAVAK NEM-VÉLETLEN ELOSZLÁSA TERMÁLIS PEPTIDEKBEN

A modellkísérletekben egyszerű molekulákból (pl. CH_4 , NH_3 , H_2O , H_2S , HCHO , HCN , stb.) gyakorlatilag azok a molekulák keletkeznek, amelyek jórészt élőben is előfordulnak, és amelyeknek száma jóval kisebb, mint a kiindulási anyagokból levezethető vegyületek száma. Mindez gyakorlatilag független az alkalmazott energiafajtától.

A kémiai evolúció a kismolekulák egymáshoz való kapcsolódási hajlama, a keletkező termékek termodinamikai stabilitása, a környezeti tényezők ismeretében elméletileg leírható. Amennyiben feltételezzük, hogy a kapcsolódás irányított jellege makromolekulákra is általánosítható, nem érdektelen ezzel kapcsolatban is kísérleteket végezni.

Fox és munkatársai találtak nem-véletlen hatásokra utaló adatokat termális peptidekben {29, 30, 31}. Ezen peptidek preparálása úgy történt, hogy 2:2:1 vagy 1:1:1 arányban keverték aszparaginsavat, glutaminsavat és 16 egyéb aminosav ekvimolekuláris keverékét, majd ezt néhány órán keresztül magas hőmérsékleten tartották (160-190 °C). A kihűlt oldadék vizes oldatát néhány napig dializálták, tisztítás céljából. Ilyen típusú termális peptidekre kapott adatokat, a görbeillesztéseket a legkisebb négyzetek módszerével végezve, ábrázoltunk a 8. ábrán. A levonható következtetések:

- a.) A polimerek átlagos molekulásúlyának hőmérsékleti függvénye 170 °C körüli hőmérsékleten minimumon megy át.
- b.) Emelkedő hőmérséklettel nő a peptidbe épülő glutaminsav mennyisége az aszparaginsav rovására. Egyéb aminosavak növekvő beépülési aránya csak 190 °C körül számottevő mértékű és ez a növekedés is az aszparaginsav ellenében mutatkozik.
- c.) Az aszparaginsav aránya N-terminális helyzetben nem változik számottevően a hőmérséklettel. Növekvő hőmérséklet a glutaminsav arányát növeli ebben a pozícióban, az egyéb aminosavakkal szemben.

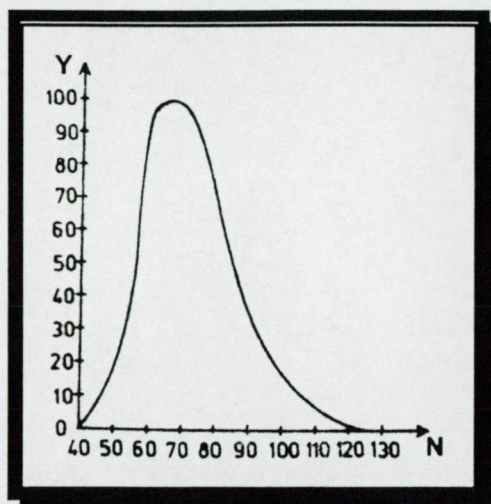


8. ábra

- a.) Molekulasúly átlagok a hőmérséklet függvényében
 b.) Aminosav összetétel az összes peptidmennyiségre vonatkoztatva
 c.) Az N-terminális aminosavak megoszlása
- Jelmagyarázat a b.) görbéken
 - ASP = aszparaginsav, GLU = glutaminsav, Egyéb = egyéb aminosav
 - ——— 2 : 2 : 1 = GLU : ASP : Egyéb - - - - - 1 : 1 : 1 = GLU : ASP : Egyéb

Szekvenciavizsgálat alapvető feltétele (általában) a peptid vagy fehérje homogenitása, hogy a vizsgált anyagban minden molekula azonos sorrendben tartalmazza az aminosavakat. Természetesen ez nem teljesül a termális peptidekre, amelyek mint izomerek bonyolult keveréke jönnek létre, azonban speciális esetekben a belső struktúráról mégis szerezhető korlátozott, részleges információ.

A tripszin a lizin vagy arginin menti peptid kötéseket hasítja. Modellrendszerünkben erre építve polimerizáltattunk két aminosavat, glutaminsavat és lizint, 1:1 arányban, 170 °C-on 3 órán keresztül, N₂ atmoszférában. 2g polimert 5 ml vízben oldottunk, majd a tisztítást Sephadex G-10-es oszlopon végeztük, ami után az anyagot liofilizáltuk. A molekulasúly meghatározás Sephadex G-50 oszlopon történt inzulin és lizozim standardra vonatkozóan (pH = 8.33). Három független kísérletből 9640 ± 120 molekulasúly átlagot határoztunk meg. Az eloszlási görbe a 9. ábrán látható.



9. ábra

Az aminosav tagszám eloszlása lizin : glutaminsav = 1 : 1 arányú termális peptidben, Sephadex G-50-en történő molekulaszűrés alapján.

- Polimerizáció: 170 °C, 3 óra, N₂ atmoszféra
- N = aminosav-tagszám, Y = a maximumra normált előfordulás.

A polimerbe épült aminosav arányt sósavas hidrolízissel, majd ezt követően ioncserélő réteg kromatográfiával, Fixion 50 x 8 rétegen a hibahatáron belül 1:1-nek határoztuk meg. A tripszines hidrolízis során 10 mg peptidet oldottunk 1 ml 0.1 M ammóniumhidrokarbonát oldatban, majd ehhez 0.5 mg tripszint adva 3 órán keresztül inkubáltuk az elegyet 37 °C-on. Ezután újabb 0.5 mg tripszint adtunk a rendszerhez és további 1 órán át tartottuk az oldatot 37 °C-on. Ezt követően triklórecetsavval csaptuk ki a tripszint, majd szűrtük az oldatot. A hasítási termékeket Fixion 50 x 8 ioncserélő rétegen választottuk el (6. táblázat).

6. táblázat

Az ioncserés rétegkromatográfiához használt oldatok

Ekvilibráló oldat	Eluáló oldat
14.1 g citromsav 8.0 g NaOH 12.3 ml HCl (d = 1.19) vízzel feltöltve 1000 ml-re	14.1 g citromsav 8.0 g NaOH 8.4 ml HCl (d = 1.19) 35.0 g NaCl vízzel feltöltve 1000 ml-re PH = 4.25, c _{Na⁺} = 0.8 N

A futtatás 15-18 cm magasságig történt, szobahőmérsékleten. Az előhívást ninhidrinnel végeztük (105 °C, 10 perc).

A kapott foltok azonosítása a következő megfontolások alapján történt (10. ábra):

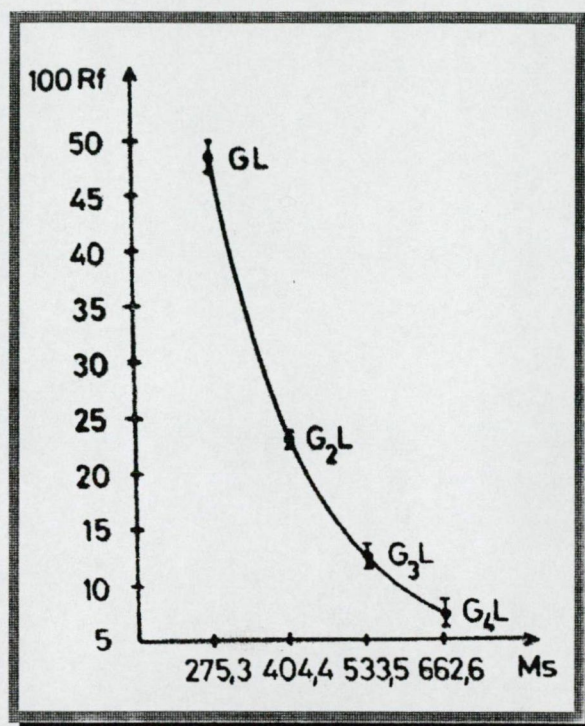
- 1.) Szabad glutaminsavra és lizinre ioncserés hatások érvényesülnek ($R_{f_{glu}} = 0.66$, $R_{f_{lys}} = 0.32$).
- 2.) A glu-lys dipeptidre az R_f -érték 0.49 körül várható ($(R_{f_{glu}} + R_{f_{lys}})/2$).
- 3.) A tripszin specificitásának megfelelően a hasítási peptidek olyan homológok, amelyek $glu_i lys$ ($i = 0, 1, 2, 3, \dots$) formulával írhatók le. Ennek megfelelően a molekulasúly - R_f összefüggésnek exponenciálisnak kell lenni. A 3. ábra szerint a mért R_f értékekre és valószínű molekulasúlyokra, 0.998 korrelációs együtthatóval, teljesül ez a feltétel ($100 R_f = 93.528 \exp -0.67221$).

10. ábra

**Triptikus hasítási termékek
elválasztása Fixion 50 x 8
ioncserélő rétegen.**

A vízszintes tengelyen a
megfeleltetett komponensek
molekulasúlyai szerepelnek.

G : glutaminsav
L : lizin



Mivel a Fixion 50 x 8 rétegekben nagymértékben térhálósított kationcserélőt használnak, nem alkalmas 5-6-nál nagyobb tagszáma peptidek elválasztására. Fixion 50 x 2 rétegen igazoltuk, hogy termális peptidek tripszines hidrolizátuma nem tartalmaz kimutatható mennyiségben 5-nél nagyobb tagszáma hasítási terméket.

Ha teljesen véletlenszerűen állnak össze a monomerek a polimer képzéskor, akkor a következő eloszlást kellene kapni tripszines hidrolízis után (G = glutaminsav, L = lizin, $r_i = (i+1)$ hosszúságú polimerek részaránya, $i = 1, 2, 3, \dots$):

$$p\{L\} = 0.5$$

$$p\{G^i\} = \frac{r_i}{2^{i-1}(i+1)} + \frac{1}{2^i} \sum_{N=i+1}^{\infty} \frac{r_N}{N+1}$$

$$p\{G^i L\} = \frac{1}{2^{i+1}} \sum_{N=i+1}^{\infty} r_N \left(1 - \frac{i}{N+1}\right)$$

7. táblázat

Triptikus hasítási termékek statisztikája

Peptid	Elméleti Tömegarány	Talált tömegarány
L	0.257	0.255
GL	0.255	0.482
G ² L	0.189	0.184
G ³ L	0.124	0.060
G ⁴ L	0.076	0.020
G	0.004	- - -

Mivel a kiindulási anyagokat ellentétes jelleműnek választottuk (glutaminsav: monoamino-dikarbonsav, lizin: diamino-monokarbonsav), egymáshoz való nagymértékű affinitásuk értelmezhető. Ennek megfelelően kapható a tripszines hasítási termékek között csaknem 50 % glu-lys dipeptid. Az elméleti és a gyakorlatban talált tömegarányokat a 7. táblázatban összegeztük.

Ez a módszer bonyolultabb, 3 esetleg 4 komponensű rendszerek analízisére is alkalmas, illetve más enzimek felhasználásával még szélesebb körben is használható. Hasonló kísérletek alapján evolúciós szempontból információkat kaphatunk az aminosav-aminosav (közvetlen) kapcsolódások irányított jellegére vonatkozóan.

Racém aminosavak antipódjainak aszimmetrikus adszorpcióját figyelték meg vízmentes szerves oldószerből (piridin) optikailag aktív kvarcot, mint abszorbenst alkalmazva {32}. Ugyanezek a kísérletek vizes oldatból negatív eredményt hoztak, tehát a D- és L-izomerek azonos arányban adszorbeálódtak. Bizonyos agyagásványok (Na-montmorillonit) optikailag aktívak lévén elvileg szintén számításba jöhetnek a szerves rendszerek evolúciójában, amikor az optikai tisztaság kialakult. Azonban az ezeken végzett szintézisek nem mutattak sztereoszelektivitást aminosavakat illetően {33}. Sőt a Na-montmorillonit racemizációt gyorsító hatását is leírták {34}. Meg kell említeni, hogy Akiyama kísérletei szerint vízmentes körülmények között az L-izoleucin stabilizálódik Na-montmorillonitra adszorbeáltatva. A csökkent racemizációs sebességi állandó miatt (10^{-13} h^{-1} , 20 °C) lehetőséget lát

arra, hogy prekambriumi kőzetekben(ből) kimutatható, optikai aktivitást jelző racemizációs arányok prekambriumi eredetűek, tehát nem szennyeződések okozták. Egyébként 2 milliárd éven túl már csak egyensúlyba jutott rendszereket találhatnánk.

10 független cikk alapján {35}, több mint 16800 (amerikai, európai, ázsiai eredetű) kvarc egykristályt véletlenszerűen véve 1%-al gyakoribbnak találták a balos kvarc kristályokat. Tény, hogy ez az eredmény nem áll ki szigorú statisztikai próbát, eszerint a differencia nem szignifikáns, de feltétlenül megemlítendő: minden cikkben (külön-külön) balos kristályokat írtak le többségben. Eszerint alacsonyabb értékű ellenőrzés (pl. előjel-teszt) alapján a különbség nem véletlen eredetű. Az eddig végzett kísérletek tanúsága szerint az optikailag aktív ásványi templátok (legalábbis aminosavakat illetően), mint evolúciós aszimmetriaforrások nem jöhettek számításba, mivel ezek a folyamatok vizes közegben folytak.

Ha elfogadjuk a Fox-féle termális peptidek evolúciós létjogosultságát {36}, akkor ebben a rendszerben (keletkezéskor magas hőmérséklet, vízmentes környezet) nem kizárt az optikailag aktív ásványok aszimmetria okozó szerepe. Glicint és DL-lizint polimerizáltattunk balos és jobbos kvarc felületén, illetve kontrollképpen kvarc nélkül. Körülmények: D- és L-lizin HCl (Fluka, Chr) 3-3 g-ját oldottuk 8 ml vízben, majd kb. 50 %-át kikristályosítottuk. Továbbiakban a levált DL-lizin 75 mg-ját kevertük 25 mg glicinnel és 100 mg optikailag aktív kvarccal, illetve a kontroll kísérletben ez utóbbi nélkül. A mintákat N_2 atmoszférában ampulláztuk és 5 órán keresztül hőkezeltük $190^\circ C$ -on. A gyantaszerű anyagok vízben való oldása után szűrés, majd Sephadex G-10-en gélszűrés következett, ahol a fronttal érkező nagy molekulájú polimereket gyűjtöttük. A mintákat UV-abszorpció és cirkuláris dikroizmus alapján kívántuk jellemezni. Az abszorpció ellenőrzés UNICAM SP 1800 spektrofotométeren, a CD mérés JASCO gyártmányú J-40c típusú cirkuláris dikroizmus spektrométeren történt (érzékenység $0.5 \text{ m}^\circ/\text{cm}$, rés szélesség 2 nm, időállandó 16 sec). A CD mérésben a jel/zaj viszony optimalizálása céljából úgy hígítottuk a mintákat, hogy az abszorpciós spektrum alapján kiválasztott 222 nm-es hullámhosszon, 1 mm-es küvetében 0.8 körüli legyen az abszorpció. Azért, hogy a koncentráció abszolút ismeretére ne legyen szükség a generálódott optikai aktivitást a Kuhn-féle anizotrópia faktorról [g] szerettük volna megadni ($g = \Delta\epsilon/\epsilon$, ahol $\Delta\epsilon$ a cirkulárisan poláros fényre vonatkoztatott abszorpció differencia $\Delta\epsilon = \epsilon_{\text{bal}} - \epsilon_{\text{jobb}}$, míg ϵ a polarizálatlan abszorpciót jelzi. Az adott kísérleti körülmények között $g \geq 7.5 \times 10^{-7}$

lehetett volna jól mérni. A kontroll minták $2(1) \times 10^{-7}$, az optikailag tiszta kvarcon kristályosított minták $7(17) \times 10^{-8}$ illetve $3(14) \times 10^{-8}$ értéket adtak az anizotrópia faktorra. Tehát ebben az irodalmilag elfogadott evolúciós modellrendszerben nem lehet kimutatni optikailag aktív kvarcok aszimmetria okozó szerepét.

A mérés technika néhány részlete

Anizotrópia faktor

Az anizotrópia faktor számításánál a hányados képzés miatt különösen fontos, hogy az alapadatok meghatározásánál a hullámhosszak helyesek legyenek. Legcélszerűbb, ha az optikai rendszer, a fényforrás, monokromátor és detektor azonos. A Jasco 40c cirkuláris dikroizmus spektrométerre megoldottuk, hogy a CD-mérésekor az abszorpció adatokat is előállítsuk a mintáról. A fotoelektronsokszorozó kimenőjelét állandó szinten tartja az automatika, oly módon, hogy a detektorra érkező csökkenő fényintenzitás esetén növeli, növekvő intenzitás esetén csökkenti a fotoelektronsokszorozó tápfeszültségét, illetve állítja a rést. A résszabályozást ki kell kapcsolni és ekkor a fotoelektronsokszorozó tápfeszültség értékét követve (természetesen referencia mintához viszonyítva, mint egysugaras fotométerben), a CD-méréssel azonos optikai rendszerben, tehát a hullámhossz azonosság biztosításával, a minta optikai abszorpciója (OD) meghatározható, az $OD = A + B \times \log(PHMT) + C \times \log(PHMT)^2$ egyenlet alapján.

Szabadalmaztatott megoldás lineáris dikroizmus (LD) mérésére {37}

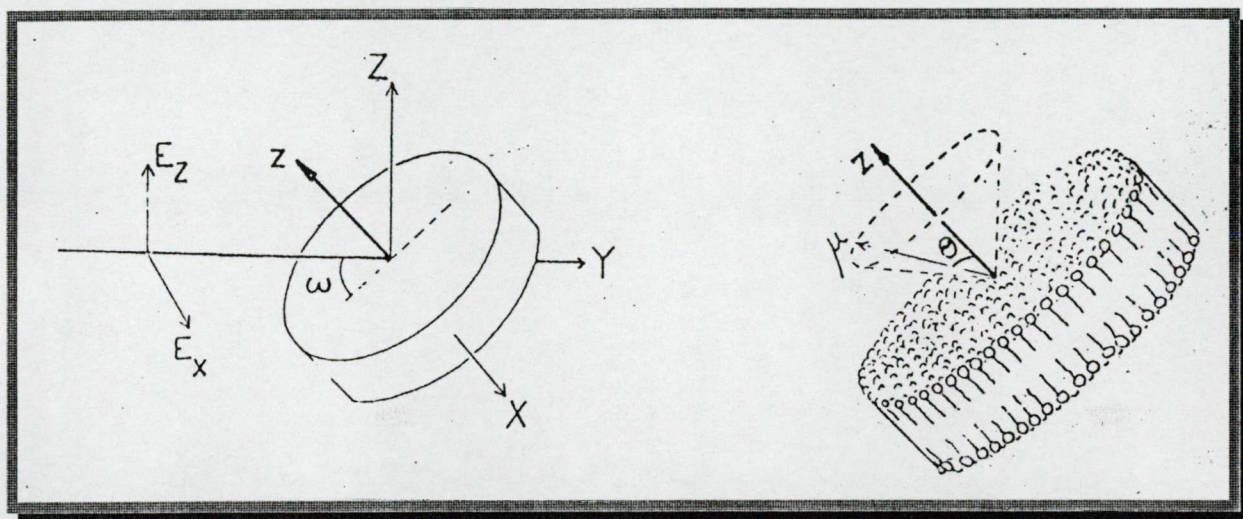
Eredeti megoldással alkalmassá tettük a Jasco 40c, eredetileg csak CD spektrométert LD mérésére is. A lineáris dikroizmus spektrometria lényege, hogy valamely minta orientált kromofórjának síkban polarizált fényre vonatkoztatott abszorpció differenciáját mérik a hullámhossz függvényében:

$$LD = \varepsilon_{\parallel} - \varepsilon_{\perp}, \text{ ahol } \varepsilon = \text{dekadikus extinkciós koefficiens } [M^{-1} \times cm^{-1}].$$

Bármely orientált anyag esetében (köbös szimmetria kivételével) LD jelentkezik, mivel a molekulák térben rögzítve vannak és a síkban polarizált fény abszorpciója jól definiált irányokban maximumot mutat. Ezek az irányok megfelelnek az átmeneti

elektromos momentum irányának. Ha a molekulaorientáció ismert, mint pl. egy ismert szerkezetű egykristályban, akkor meghatározhatók az átmeneti momentum irányok a molekuláris tengelyrendszer vonatkozásában. Másrészt, ha az átmeneti momentum irányok ismertek már, akkor az LD mérés az ismeretlen szerkezetű anyagon információt adhat a molekulaorientációról. Az LD-spektrometria biológiai minták kromofórjainak orientáció meghatározásával nagymértékben segítheti összetettebb biológiai struktúrák leírását. Membránok, membránmodellek kromofórjainak orientáció vizsgálatára különösen jól használható lehetőség az LD spektrometria, mivel a mérésre az alap membránstruktúra megváltoztatása nélkül, nagyon alacsony kromofór-koncentrációnál sor kerülhet {38}. Ez azonban nem kivitelezhető derékszögű optikával. A membrán célszerűen ω szöget zár be a mérőfény haladási irányával (11. ábra).

11. ábra



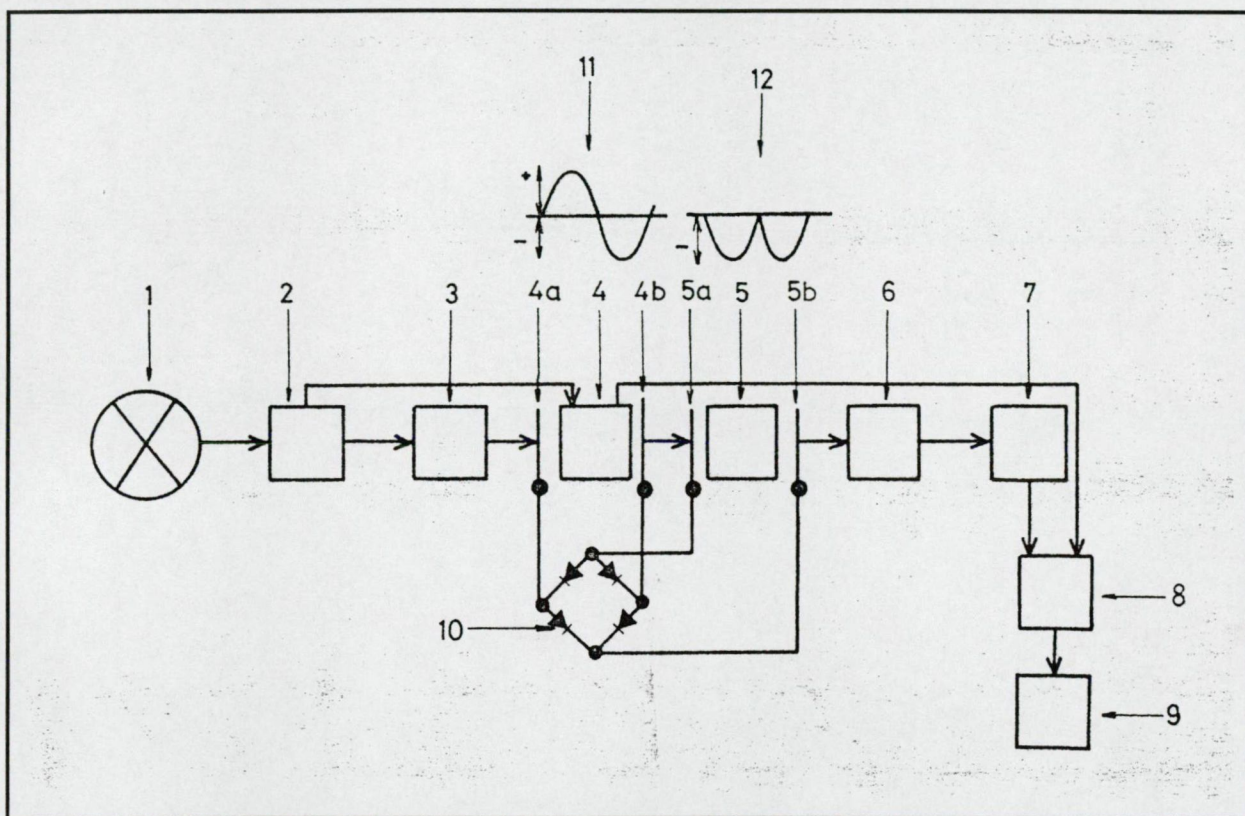
Ekkor:

$$LD(\omega) = \frac{3}{2} \times 3 \times \cos^2 \Theta - 1 \times \cos^2 \omega \times n^{-2} \times \frac{1 - \cos^2 \omega}{n^2}^{-\frac{1}{2}} \times \epsilon_r + LD_r$$

ahol Θ a $\vec{\mu}$ átmeneti momentum és z optikai tengely által bezárt szöget jelzi, LD_r a polarizált reflexió hozzájárulása, n = refrakciós index, ϵ_r = random abszorpció.

A gyárilag jelenlévő, nem módosított fáziscsatolt erősítőnek és jelfeldolgozó rendszernek köszönhetően az érzékenység akkora lehet, hogy pl. egy bimolekuláris lipidrétegben 1%-ban jelenlévő karotin orientációja is kimérhető. Az alábbi ábrán összefoglalt lehetőség alkalmazható elektrooptikai modulátorral ellátott új CD készülékekben, de beépíthető a már működőkbe is, utólag. Egy teljes Nobel-munkaértékezetet {39} szántak a nagyérzékenységű LD-mérés

problematikájának, ami elsősorban abból adódott, hogy CD készülékben előálló balra és jobbra cirkulárisan poláros fényt fix $\lambda/4$ fázistoló eszközökkel próbálták lineárisan polárossá tenni és ez bonyolult korrekciókra kényszerítette a felhasználókat {40} a fix fázistoló meghatározta λ -értéktől eltérő bármely hullámhossznál. Az itt leírt megoldás automatikus és megoldja a hivatkozott munkaülés elektrooptikai modulátorral ellátott CD készülékek LD mérésre alkalmassá tételére vonatkozó problémáit (12. ábra). A prototípust egy japán gyártmányú Jasco 40c CD-spektrométerbe építettük és teszteltük, de Varian (USA), Jouan (Francia) és más (kísérleti) hasonló készülékekben is megvalósítható.



12. ábra

Szabadalmazott megoldás elektrooptikai modulátorral ellátott cirkuláris spektrométerek automatikus lineáris dikroizmus mérésre alkalmassá tételére

Jelmagyarázat: 1 – Xenon-lámpa, 2 – monokromátor, 3 – lineáris polarizátor, 4 – első elektrooptikai modulátor (a és b vezérlőelektrodokkal), 5 – második elektrooptikai modulátor (a és b vezérlőelektrodokkal), 6 – minta, 7 – fotoelektronsokszorozó, 8 – fáziscsatolt erősítő, 9 – rekorder, 10 – teljes hullámú egyenirányító nagyfeszültségű diódákkal (pl. BAY 26)

Xenon lámpa fényét monokromátoron átvezetve prizma állít elő lineárisan poláros fényt, majd elektrooptikai modulátoron, vagy más néven Pockel cellán ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{KD}_2\text{PO}_4$ egykristályok, megfelelő felületeken elektródokkal) halad át a fény. Az elektródokon a hullámhossz függvényében alkalmaznak váltakozó feszültséget

olyan amplitúdóval, hogy éppen $\lambda/4$ fáziskésés álljon elő. Ez a CD-méréshez szükséges balra és jobbra cirkulárisan poláros fényt biztosítja (első cella). Normálisan (CD-mérés) a nyaláb áthalad a mintán, és fáziscsatolt erősítő dolgozza fel a cirkulár-komponensekre kapható abszorpció különbséget (CD). Ha egy második Pockel-cellát helyezünk a fényútba, aminek a vezérlését az eredeti cella AC-feszültségének teljes hullámú egyenirányítása (4 x BAY 26) után nyert lüktető egyenárammal oldjuk meg, akkor vertikálisan és horizontálisan lineárisan poláros fényre vonatkoztatott abszorpciókülönbséget (LD) detektálhat az egyébként változatlan rendszer, alkalmas mintából. Feszültségmentes állapotban a második cella a CD-mérést nem zavarja. Az LD-mérés érzékenysége elérheti a 10^{-6} OD különbséget és teljesen automatikus.

AMINOSAVSORRENDBŐL LEVEZETHETŐ NEM-VÉLETLEN TENDENCIÁK NÉHÁNY FEHÉRJÉBEN

Mai fehérjék szerkezetében keresünk szabályszerűségeket. Aminosav-párok eloszlásával kapcsolatban Hopfinger {41} definiált egy ún. szerkezeti (S) faktort, amely mértéke aminosav-párookra vonatkozóan a véletlen alapon várható eloszlástól való eltérésnek. Adott X aminosavra az X - Y pár megtalálásának valószínűsége:

$$P\left(\frac{X-Y}{X}\right) = \frac{N(X-Y)}{\sum_i N(X-A_i)}, \text{ ahol}$$

$N(X - Y) \Rightarrow$ a talált $(X - Y)$ párok száma,

$N(X - A_i) \Rightarrow$ az összes aminosav-párok száma, amiben X baloldali.

Y aminosav megtalálásának valószínűsége véletlen alapon:

$$P(Y) = \frac{N(Y)}{\sum_i N(A_i)}, \text{ ahol}$$

$N(Y) \Rightarrow$ az összes Y aminosav száma a mintában,

$N(A_i) \Rightarrow$ az összes aminosav száma.

A hányados mértéke a véletlen eloszlástól való eltérésnek:

$$S \frac{(X-Y)}{X} = \frac{P \frac{(X-Y)}{X}}{P(Y)}.$$

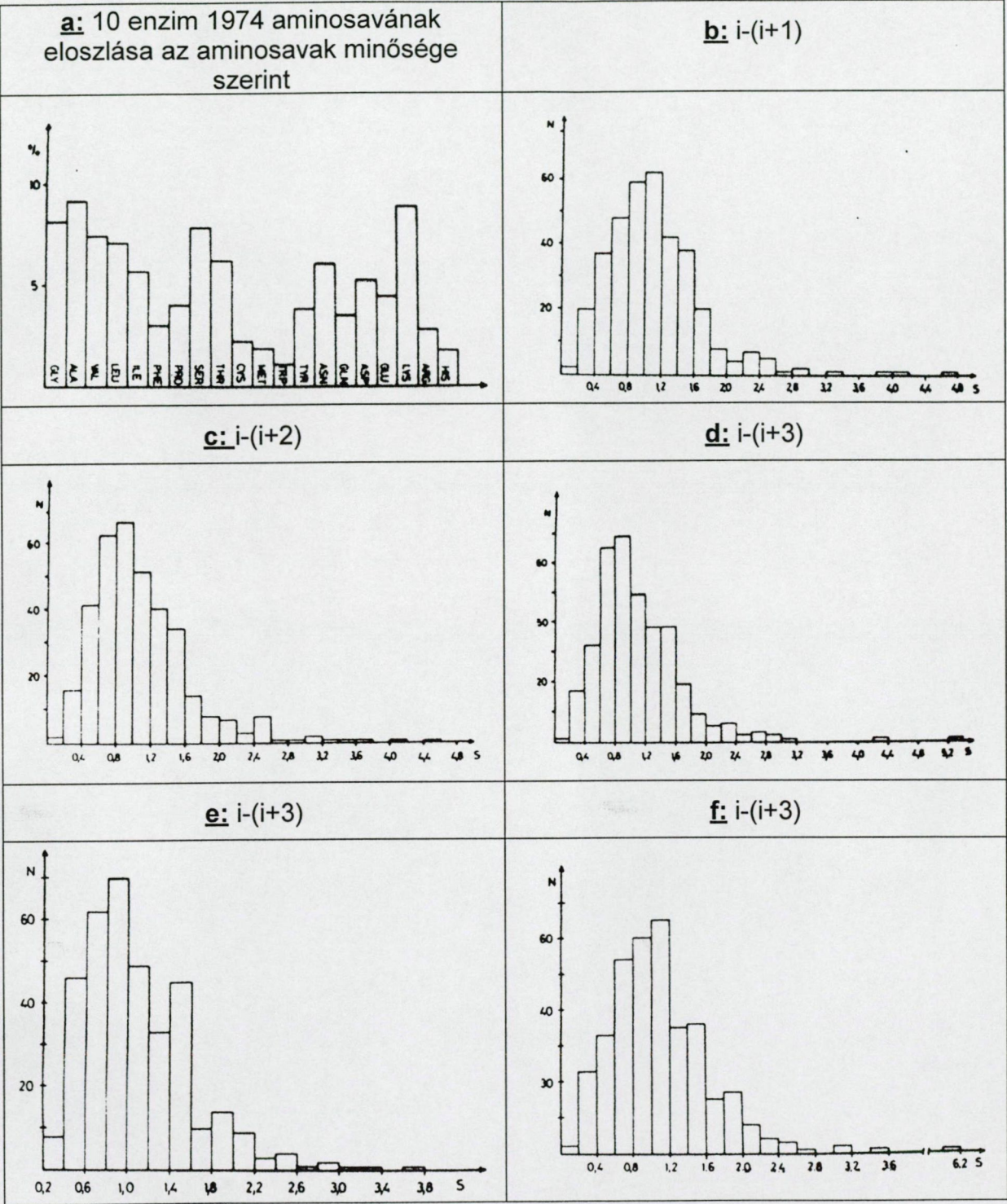
Érdekesnek tartottuk megvizsgálni, hogy enzimműködésre specializálódott fehérjékben milyen eloszlás adódik, ha nemcsak a közvetlen szomszédokat nézzük, hanem távolabbi párok között is keresünk összefüggést. 10 enzimet vizsgáltunk meg, amelyek a következők voltak:

citokróm c (ember, csimpánz)	penillináz (Staphylococcus aureus PC1)
kimotripszinogén A(szarvasmarha)	ribunukleáz (szarvasmarha hasnyálmirigy)
glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (sertés)	ribunukleáz T ₁
lizozim (T ₄ fág)	tripszinogén (szarvasmarha)
nukleáz (Staphylococcus aureus V8)	triptofán-szintetáz, A protein (E. coli)

Az összes aminosav száma 1974-nek adódott, az egyes aminosavak előfordulási arányát az 13. ábrán az a-hisztogram mutatja, míg b-től f-ig azok az ábrák láthatóak, amelyeken az $S \frac{(X-Y)}{X}$ eloszlását tüntettük fel úgy, hogy változtattuk az aminosavpárok közötti távolságot (1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, az ábrák fölött jelezve).

13. ábra

Az $S \frac{(X-Y)}{X}$ eloszlás, az aminosavpárok közötti távolság változtatásakor



Finkelstein és munkatársai {42} csoportosítását elfogadva megvizsgáltuk többek között azt, hogy milyen arányban fordulnak elő potenciálisan helikális részek a szerkezetben. Ez a csoportosítás a következő:

- **helikális** aminosavak: ala, glu, his, leu
- **anti-helikális** aminosavak: asn,cys, gly, pro, ser
- **neutrális** aminosavak: arg, asp, gln, ile, lys, met, phe, thr, trp, val

Azzal a feltétellel, hogy helikális egy szakasz fehérjén belül, ha minimum három kifejezetten helikálisnak mondott aminosav és maximum két neutrális aminosav képzí a kérdéses peptidrészletet, a helikális szakaszok aránya 7.35 %. A helikális aminosavak összes előfordulásának mintegy negyedében állapítható meg, hogy valóban helikális szakaszban találhatók.

Következtetések:

- * **Közvetlen szomszédok közül legnagyobb "affinitású" párok:**
his-phe, trp-trp, trp-gly, arg-trp, his-met, ser-trp, met-phe, gln-cys, arg-gln, his-glu, his-cys, phe-arg, trp-tyr, leu-met
- * **Nem fordulnak elő:**
val-trp, leu-cys, phe-trp, pro-cys, cys-trp, met-pro, trp-ala, trp-leu, trp-glu, trp-lys, his-gln, his-arg, leu-tyr, pro-arg, met-cys, trp-phe, trp-his, his-his, phe-phe, ser-his, met-trp, trp-cys, tyr-phe, phe-pro, phe-met, cys-ile, cys-cys, met-arg, met-his, trp-met, trp-asn, tyr-trp, tyr-arg, his-gln, his-arg, his-his

Sok esetben sztérikus okokkal magyarázható, hogy meglehetősen nagy az elő nem forduló aminosav-párok száma, de ez nem általánosítható minden esetre. Vegyük alapul az alábbi csoportosítást:

- Negatívan töltött aminosavak (N): asp, glu
- Pozitívan töltött aminosavak (P): arg, his, lys
- Dipólus jellegű aminosavak (D): asn, gln, ser, thr
- Dipól-hidrofób jellegű aminosavak (Dh): cys, met, trp, tyr
- Rövid láncú alifás aminosavak (a): ala, gly
- Hosszú láncú alifás aminosavak (A): ile, leu, phe, val

33 esetből 24 % került ki az A-Dh ill. Dh-A csoportból, 21 % a Dh-Dh csoportból, 15 % a Dh-P csoportból. A nagy affinitású párokra nem mutatkozik kiugró érték az előbbi csoportosításban. Általánosságban megfigyelhető összefüggések, az előző csoportosításnak megfelelően:

S < 0.8	S > 1.2
N-Dh	N-a
P-D	F-N
P-a	P-Dh
D-A	P-A
A-a	D-Dh

FEHÉRJÉK SZERKEZETBECSLÉSE AMINOSAV-SZEKVENCIÁK ALAPJÁN (SZABÁLYSZERŰSÉGEK SZERKEZETBECSLÉSRE) {43}

A háromdimenziós (3D), főként röntgensugárzáson alapuló szerkezetvizsgálatokkal meghatározott fehérjeszerkezeteket széles körben használják és elfogadják a biológiában és az átfedő tudományterületeken {44}. Az atomi koordinátákat nagy adatbankokban lehet megtalálni. Ezeket az adatokat (főként) fehérjekristályok előállítását követő röntgenkristallográfiai módszerekkel nyerték. Globuláris fehérjékre vonatkozóan nagyjából általánosan alkalmazható kristályosítási módszerek ismertek. Transzmembrán fehérjékkel kapcsolatban (úgy tűnik) alkalmanként egyedi rendszereket kell kidolgozni, így ezen a területen korlátozottan állnak rendelkezésre 3D-adatok (pl. bakteriorodopszin, fotoszintetikus reakciócentrum). A kristályosítási nehézségek jelentik az egyik okot, hogy szerkezetbecslésre szükség van. DNS-szekvenálási munkák gyakran vezetnek oda, hogy az adatokból levezethető fehérje még nincs izolálva, és/vagy funkciója nem meghatározott. A primer szerkezet alapján sokszor jól becsülhető a funkció illetve segíteni lehet a biokémikust, hogy hol keresse az adott fehérjét a sejtben {45}. Egy másik fontos alkalmazott irány immunológiai, amely epitópok felismerését célozza analitikai felhasználásra, vagy pl. vakcinálásra alkalmasnak tűnő szekvenciák jelölhetők ki.

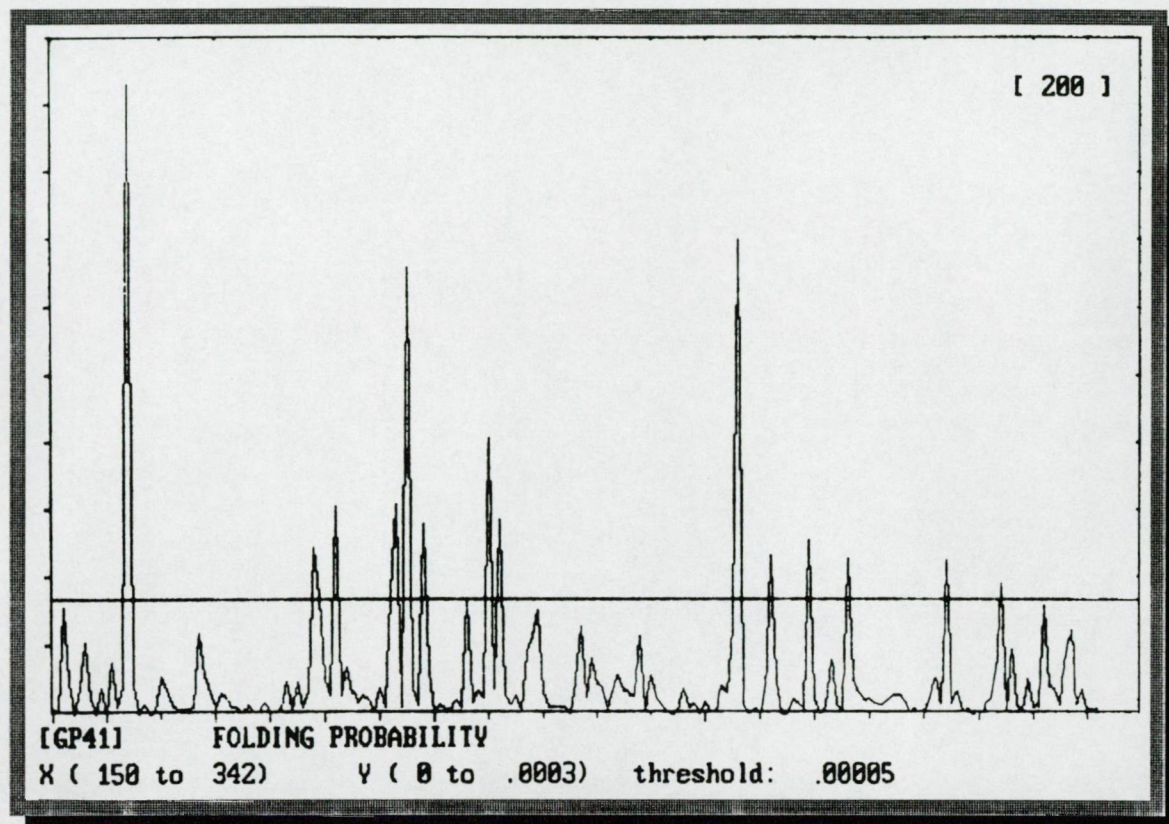
Ami ezt a fejezetrészt az előzőekkel összekapcsolja az, hogy ismert szerkezetekből próbálunk felismerni, levezetni szabályokat, amelyek általánosságban használhatóak egymagukban, vagy komplex kombinációkban visszafelé. E szabályokkal végzett szerkezetbecslések összevetése más, megbízható módszerekkel nyert szerkezeti adatokkal jelzi a dedukcióval nyert ismereteink valós információtartalmát is. Saját tapasztalataink és irodalmi adatok alapján is úgy tűnik, hogy egyik prediktív módszer sem áll meg a lábán egymagában, de kombinációik sikeresek lehetnek {46}.

Egy fehérje aminosav sorrendje önmagában a natív szerkezet kialakulásához szükséges információk jelentős részét tartalmazza {47}. A fehérjeváz (leegyszerűsítve) hidrogénhidak hálózata által stabilizált, α -hélixek és β -lemezek meghatározott és szabálytalan hurkokkal megszakított szerkezeti egységeiből áll össze úgy, hogy ezen elemek kölcsönhatásai létrehozzák a komplett struktúrát (vagy egy magasabb szintű szerkezet egy blokkját). A predikciós eljárások statisztikai {48},

sztereokémiai és más fizikai-kémiai megfigyeléseken alapulnak {49}, de a számítási teljesítmények növekedtével egyre jobban teret nyer a kvantumkémia {50}.

A másodlagos szerkezeti predikciók terén, valószínűleg az egyszerűsége miatt, a Chou-Fasman módszer {51} vált talán a legnépszerűbbé. Az alapadatok röntgendiffrakcióval meghatározott 3D fehérjeszerkezetekből levezetett P_α és P_β paraméterek, amelyek az α -hélix illetve β -lemez képzési hajlamot számszerűsítik statisztikai alapon. A paraméterek számítása úgy történt, hogy az egyes aminosavak α -, illetve β -szerkezetben való előfordulását számolták meg az adatbázisban és osztották az összes aminosavak számával. Gyakorlatban egy, az egész, éppen vizsgált, szekvencián egy aminosavas léptékkel végigvonuló tetrapeptid-ablakban számítandó a P_α és P_β paraméterek behelyettesítésével az átlag α -hélix, illetve β -lemez formálási hajlam. A kapott hajlam-profil görbén az 1.05 érték fölötti pontok azok, amelyek valóban nagy valószínűséggel a profil típusának megfelelő másodlagos szerkezetben vannak. Átfedően 1.05-nél magasabb értékek esetén a nagyobb a domináns. A módszer kiegészül Lewis és munkatársai valódi statisztikai valószínűségen alapuló számításával, ami a β -kanyarulat (turn/bend) előfordulások helyét jelölheti ki. Röntgennel meghatározott, biztosan β -kanyarulatot formáló struktúrákból i , $i+1$, $i+2$ és $i+3$ pozíciókban a különböző aminosavak előfordulási gyakoriságát (f) táblázatban foglalták össze. Ismeretlen szekvenciában annak a valószínűsége, hogy egy tetrapeptid β -kanyarulat az i -edik pozícióban kezdődik egyenlő $f_{(i)} \times f_{(i+1)} \times f_{(i+2)} \times f_{(i+3)}$. A tapasztalati úton megállapított valószínűségi határérték $5 \cdot 10^{-5}$, amely felett egy tetrapeptid β -kanyarulatot formálhat (14. ábra). Ennek további feltétele, hogy ugyanitt az α - és β -formálási hajlamot jelző görbék 1.05 alatti értéken legyenek. Azokat a struktúrákat, amelyek mindenben a jelzett határértékét alatt vannak rendezetlennek minősítendő. A módszer tovább finomítható az egyes aminosavakra, illetve rövid (speciális összetételű) peptidszegmensekre bevezethető egyedi szabályokkal {51}, de ez bonyolítja az értelmezést. A kiinduló paramétereket csak tudományosan jól megalapozott indokok alapján szabad megváltoztatni, mert egyébként egy-egy kiemelt struktúrára könnyedén lehet kiváló illeszkedést generálni, de a módszer elveszti általános érvényét. A paraméterek meghatározásához az alapadatbázis méretének növelése nem javította a predikciók megbízhatóságát {52}, aminek oka

valószínűleg az, hogy az analízisre beállított tetrapeptid szerkezet csak rövid távú kölcsönhatások figyelembevételét engedi.



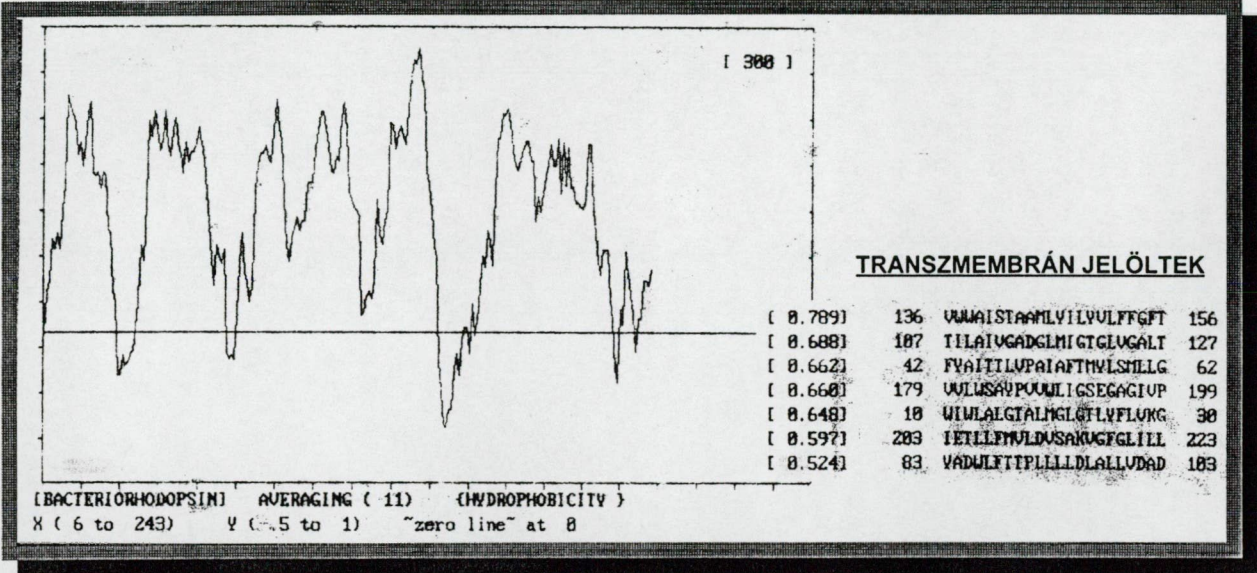
14. ábra

β -kanyarulatok valószínűsége a GP41-fehérje 150-ik aminosavától kezdődő szakaszán. A valószínűségi határvonal $5 \cdot 10^{-5}$ -en húzódik.

Jobb eredmények érhetőek el az irány-információs, vagy más néven GOR (Garnier-Osguthorpe-Robson) módszerrel [53], ami egyszerűbb és következetes, könnyebb számítógépre vinni. Középtávú kölcsönhatások figyelembevételével négy lehetséges állapotból egy valószínűsíthető a vizsgált szekvencia i -edik aminosavára, mint α -hélix [H], β -lemez [E], β -kanyarulat [T], és rendezetlen [C]. A kiválasztott (i -edik) aminosav 8-8, az N-, illetve C-terminális irányba eső szomszédjának szerkezeti hozzájárulása figyelembevételre kerül. Az információelméleti alapon meghatározott, számításban használható paraméterek hidrofobicitási és kooperativitási információkat is hordoznak, mivel ezek az adott szerkezeti elemek stabilizálásában fontos tényezők. Gyakorlatban egy 17 aminosavból álló ablak mozog a szekvencia mentén, amelynek a közepén elhelyezkedő aminosavára határozható meg a strukturális információ. Az információs paraméterek külön-külön összegzendők a négy lehetséges konformációs

ablak közepén szereplő) aminosav másodlagos szerkezeti státuszát. Egy adott típusú heptapeptid (néha több) különböző konformációs állapotokban létezhet, ezért további finomítások szükségesek: a homológia mértékének redefiniálása {58, 59}, az alkalmazott ablak méretének növelése, nagyobb szótáradatbázis használata. Ha teszt-szekvenciát az alapadatbázisból választunk, akkor az eredeti, röntgendiffrakcióval megállapított konformációs állapotokkal összevetve 70% körüli helyes predikcióval, ez a módszer kiemelten jól működik.

Általánosan elterjedt módszer az aminosavak hidrofobicitását mérő paraméterek mozgó ablakban történő átlagolása {60}. Az így kapható hidrofobicitási profil (16. ábra) pozitív csúcsai transzmembrán szegmenseket jelölhetnek ki (pl. bakteriorodopszin), de információvesztés is jelentkezhet, amire figyelni kell.



16. ábra
Hidrofobicitási profil

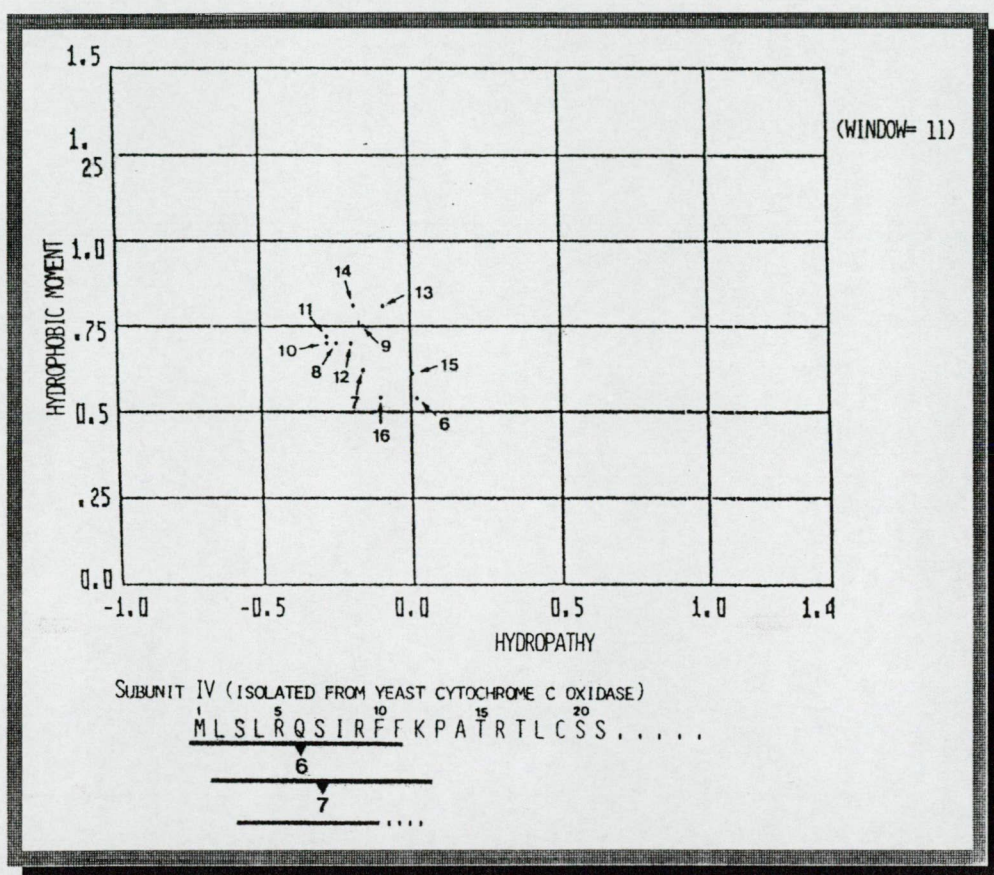
Az ún. hidrofób momentum (μ), amelyet eredetileg D. Eisenberg {61, 62} javasolt, meglehetősen informatív lehet (17 ábra). A számítás figyelembe veszi a másodlagos szerkezet hozzájárulását egy kijelölt peptidszegmens eredő hidrofobicitásához. Úgy tűnik, hogy az irodalomban közölt, egyedi hidrofobicitási skálákhoz képest jobb eredménnyel használhatóak konszenzuson alapuló skálák, mert ez javított a jel/zaj viszony vonatkozásában. A hidrofób momentum-ábrán az átlag hidrofobicitással szemben az adott másodlagos szerkezetben adódó hidrofobicitási vektorösszegek határoznak meg pontokat:

$$\mu(\delta) = \sqrt{\sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n)^2 + \sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n)^2}, \text{ ahol}$$

μ = hidrofób momentum

$\delta = \frac{2\pi}{m}$, az alapvázból kiemelkedő, egymást követő oldalláncok közötti szög radiánban mérve, amikor a periodikus szerkezetű szegmenst (tengely mentén) főlülről lefelé nézzük (m = az aminosavak száma menetenként)

$$\mu(0) = \sum_{n=1}^N H_n \Rightarrow \text{a hidrofobicitási profilt adja.}$$



17. ábra

A citokróm c oxidáz IV. alegység szignál-szekvenciája a hidrofób momentumok alapján felületaktív karakterű

A számításban kiválasztott szegmens a hidrofobicitás $\Rightarrow \mu(0)$, illetve momentum $\Rightarrow \mu(\delta)$ adatok alapján sorolható osztályba:

- közepes vagy alacsony momentum és jellemzően hidrofíl átlag a globuláris fehérjékre jellemző
- magas momentum felületaktív, amfipatikus szakaszok jellemzője

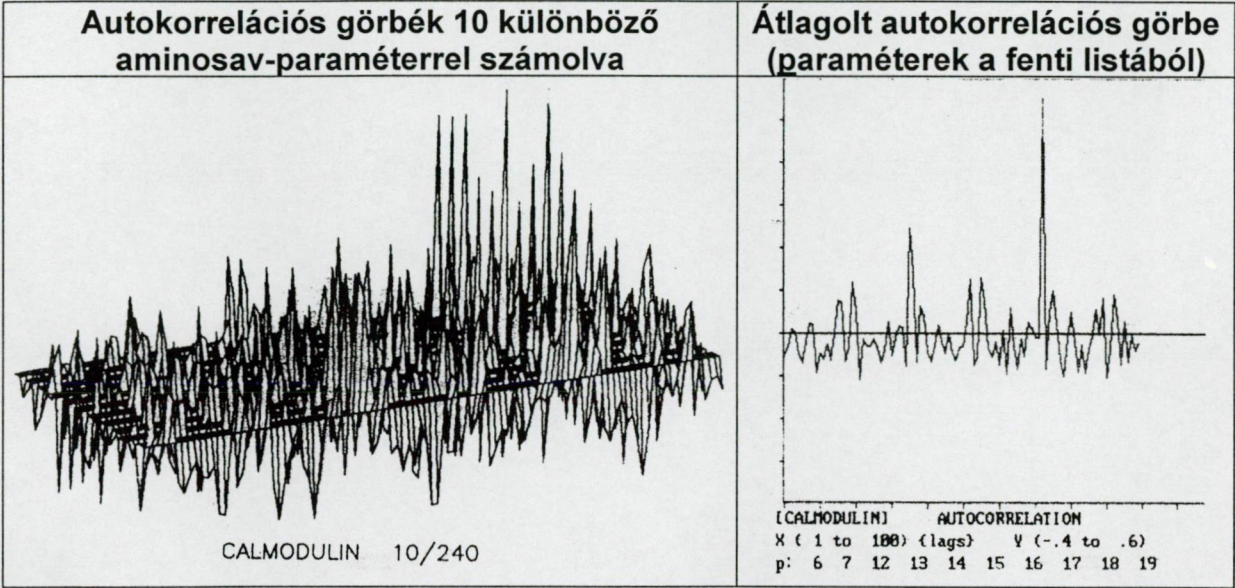
- alacsony momentum és átlagban hidrofób karakter a potenciálisan multimer transzmembrán szegmenseket jelöli ki
- nullához közeli momentum magas átlagos hidrofobicitással a monomer jellegű transzmembrán szegmenst jelezheti, amennyiben az adott darab elegendően hosszú, hogy átértse a membránt

Strukturális homológiák közvetlen (szekvencia alapú) tanulmányozására jól kidolgozott algoritmusok és programok találhatóak az irodalomban. Kiemelni érdemes az auto- [azonos szekvencián belüli ismétlődés(ek) kimutatására] és keresztkorrelációs [különböző szekvenciák közötti hasonlóság(ok) detektálására] számítási lehetőségeket {63}, amelyekkel nemcsak strukturális, de funkcionális homológiák is felismerhetők (18. ábra). A korrelációs együtthatók -1 és $+1$ között adódnak. $+1$ közeli érték az összehasonlított szegmensek tulajdonságaiban **azonos tendenciákat**, míg -1 közeli értékek **ellentétes tendenciákat** jeleznek. A korrelációs függvények általában zajosak, de a jel/zaj arány nagymértékben javítható több tulajdonság paramétereivel nyert korrelációs görbék átlagolásával. A mellékletben szereplő, (a 77. oldaltól) kilistázott program futtatásakor az alábbi paramétereket használtuk:

1. Normalizált konszenzuson alapuló hidrofobicitási skála {64}
2. Konszenzuson alapuló hidrofobicitási skála [Faraday Symp.Chem.Soc. 17(1982)109]
3. Hidropátia {65}
4. Hidrofilicitás {66}
5. Acrofilicitás [Hopp]
6. α -hélix formálási hajlam [Chou és Fasman, Adv. In Enzymology 47(1978)45]
7. β -lemez formálási hajlam [Id. 6]
8. folding valószínűségek (i)
9. folding valószínűségek (i+1)
10. folding valószínűségek (i+2)
11. folding valószínűségek (i+3)
12. oldallánc-tömeg {67}
13. relatív mutabilitás x 0.01
14. polaritás {64}
15. hidrofobicitás {64}
16. pK-N
17. pK-C
18. átlagos nem-kötő energia / csoport (Kcal/mól)
19. átlagos nem-kötő energia / atom (Kcal/mól)
20. BNORM0 [Naturwissenschaften 72(1985)212]
21. BNORM1 [Id. 20]
22. BNORM2 [Id. 20]
23. flexibilitás
24. töltés

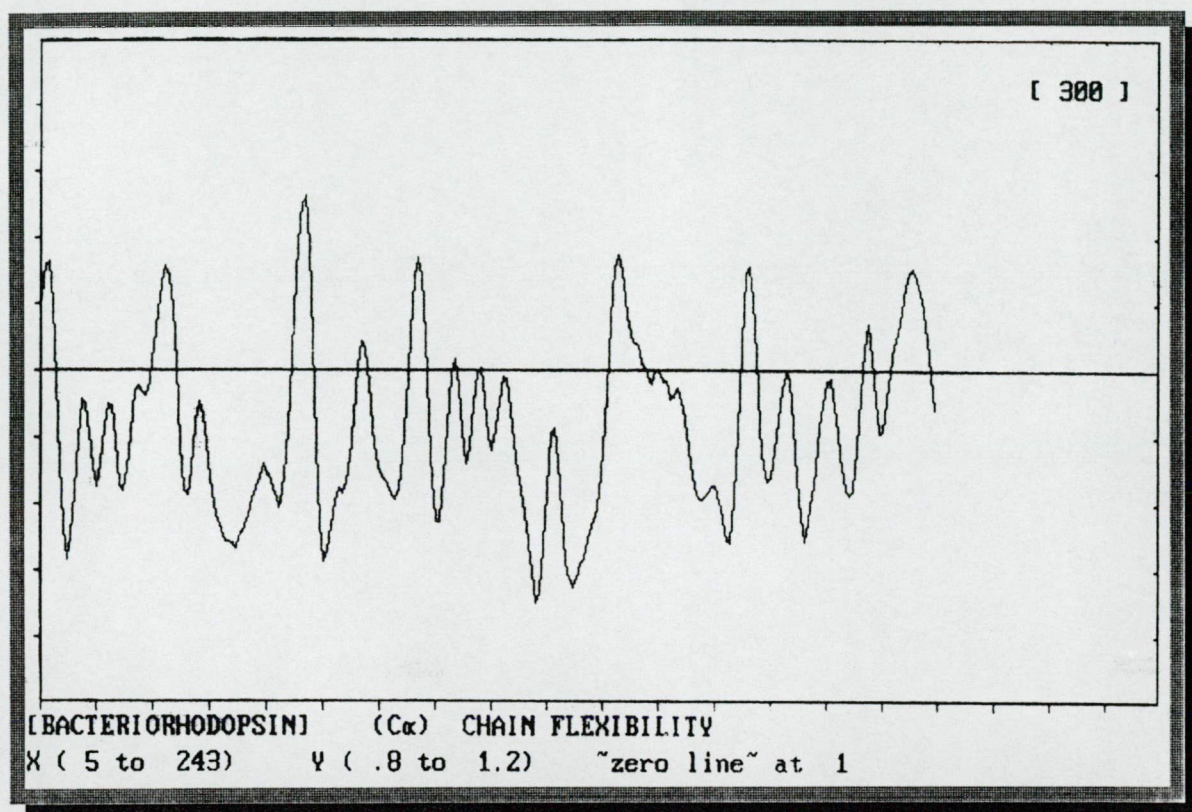
A felhasználó számára megengedett a lista változtatása, tehát más paramétersorok is használhatóak, illetve beépíthetők (a hidrofobicitás nagyon gyakori elem, mint az irodalomból is kitűnik az alábbi példák kapcsán): molekulasúly, a genetikai kód szerinti triplett(ek) száma per aminosav, refraktivitás {64}, optimalizált hidrofobicitás {68}, más hidrofobicitási skálák {69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77}, membrántakart hélix paraméter {78}, hidratációs potenciál {79}, antigenicitás {80}, kromatográfiás mozgékonyaság (Rf) {81}, globuláris fehérjén belüli előfordulás aránya {82, 83, 84}, konformációs paraméterek {85, 86, 87}, aminosav összetétel {88, 89}.

18. ábra
A calmodulinon belüli ismétlődések azonosítása autokorreláció alapján.



Az említett programmal átlagolás, Fourier transzformáció, korreláció, stb. számítások végezhetőek, nagy szabadsággal adva komplex analízis lehetőségét a felhasználónak. Bevált taktika egy immunaktív hely azonosítására, ha a fehérjefelületi hozzáférhetőség igazolását követően a jelöltek hidrofilitása és mozgékonyasága alapján történik további szelekció, osztályozás {90}. Általánosságban β -kanyarulatok a fehérje felületén (kívül, szintben, vagy belülről közel a felszínhez) helyezkednek el. Amfipatikus hélixek szintén jó jelöltek. A Chou-Fasman módszerhez hasonlóan a különböző aminosavak eloszlása (részvételi hajlama) meghatározható igazoltan immunaktív struktúrákban, aminek alapján egy ismeretlen szekvenciára ún. immunogenicitási profil rajzolható. Egy szegmens mozgékonyasága egy röntgenkristallográfusok által általában "nem kedvelt" paramétersor segítségével becsülhető. Fehérjekristályokban az atomi komponensek

pozíciója meghatározását annál nagyobb pontatlansággal tudják meghatározni, minél mozgékonyabb az aktuális atom. E bizonytalanság mögé ún. hőmérsékleti faktort rendeltek a krisztallográfusok. Ismert szerkezetű fehérjék aminosavainak peptidkötésekben résztvevő α -szénatomjaira vonatkozó normalizált hőmérsékleti faktorokat (B_{norm}) felhasználva ismeretlen fehérjék mozgékonyabb szakaszaira jó hatékonysággal tehető becslés. Hidrofobitási adatok alapján a 16. ábra már mutatta a bakteriorodopszin transzmembrán szegmenseit. A peptidlánc mozgékonyági görbéje látható a 19. ábrán. Az i -edik C_{α} -atomra meghatározott relatív

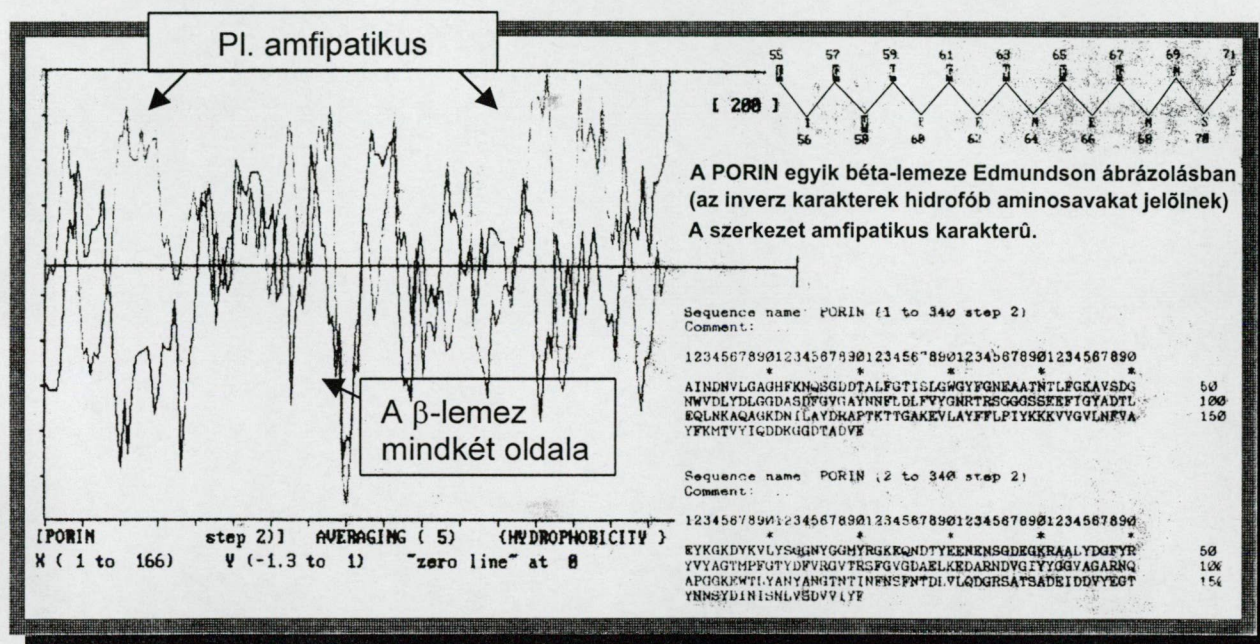


19. ábra

Normalizált hőmérsékleti faktorok alapján becsült C_{α} mozgékonyság. Az ábra (a bakteriorodopszin esetében) kiegészíti a hidrofobitási adatokból nyerhető információt.

mozgékonyági adat a szomszédoktól függő B_{norm} -értékek súlyozott összege, amelyek az $i-3$, $i-2$, $i-1$, i , $i+1$, $i+2$, $i+3$ pozícióban található aminosavak minőségétől függenek. A flexibilitási görbén a vonal feletti, egynél nagyobb értékek a transzmembrán periódusok közötti mozgékony szakaszokat jelölik ki, a Henderson-modellel teljes összhangban. Az eredeti példánál maradva, a flexibilitási görbe alapján egy natív fehérje immunológiai szempontból számba jöhető darabjai

Helikális transzmembrán szekvenciákra sokszor megfelelően kifejező az átlagos hidrofobicitás, de más szerkezetek esetén (β -lemez), pl. a porinok esetében nem működik az egyszerű átlagolás: félrevezető neutrális érték adódik a kísérletileg azonosított transzmembrán darabokra is. Az alábbi, 20. ábra jobb felső negyede a porin egyik (β -lemez szerkezetű) szakaszát mutatja. Tisztán látható a hidrofil-hidrofób aminosavak aszimmetrikus eloszlása. Elemi trükkkel helyére tehető az átlagolásban a másodlagos szerkezet hatása: mesterséges szekvenciákat kell generálni a β -lemezek két oldaláról, tehát egy-egy sort a páratlan illetve páros sorszámú aminosavakból.



A porin β -lemezeinek amfipatikus karaktere felismerhető, ha a szekvencia páratlan és páros aminosavait egymással átfedésben, külön vizsgáljuk.

49

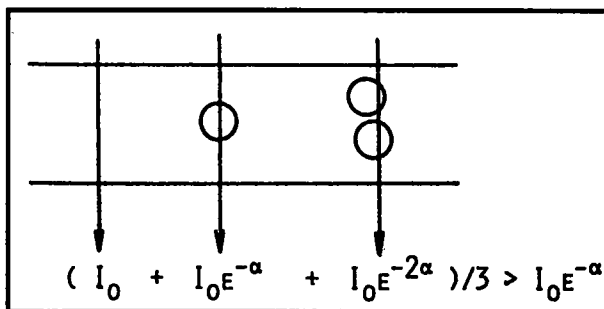
Fehérje másodlagos szerkezet meghatározás membrán szuszpenziókban cirkuláris dikroizmus spektrum alapján

A cirkuláris dikroizmus (CD) spektroszkópia általánosan használt módszer különböző másodlagos szerkezeti formák arányának meghatározására fehérje oldatokban. A CD, adott hullámhosszon egyenlő a balra és jobbra cirkulárisan poláros fény mintán mért abszorpció különbségével, amiből fehérjékre általánosságban egyértelműen a hélix tartalom számítható {91}. Lényeges, hogy ez tiszta oldatokra igaz. Fényt szóró mintákon az egyéb zavaró hatások olyan mértékűek lehetnek, hogy az eredményeket (korrekció nélkül) használhatatlanra torzítják. Az egyik leglényegesebb tényezőt az ún. lapulási effektus okozza. Kidolgoztunk egy módszert, amellyel a mért CD-t korrigálni lehet és így fényeszóró mintákból is elfogadhatóan határozható meg az aktuális hélix-tartalom. A korrekciós eljárást poli-L-lizin-azolektin vezikulákon, patkány máj-mitokondrium szuszpenziókon és különböző membránkött (szív-sarcolemma) ATP-ázokon alkalmaztuk.

Membránkött fehérjék optikai spektruma legnagyobb mértékben az alábbiak miatt torzul:

1.) *Fényszórás*. A nem polarizált fényre vonatkoztatott optikai denzitást alapvetően zavarja, de a szelektív szóráskülönbség a balra illetve jobbra cirkulárisan poláros fényre elhanyagolható.

2.) *Abszorpció ellapulás (flattening)*. Híg szuszpenziókban sajátosan alakul a foton-részecske statisztika, különböző elemi nyalábocskák eltérő számú részecskével találkozhatnak. A hatás szignifikáns.



3.) *Abszorpciós homály (obscuring)*. Koncentráltabb szuszpenziókban a részecskék oly módon takarják ki egymást, hogy a mögöttes elemeket nem érheti fény. Megfelelő hígítás beállításával ez az effektus kiküszöbölhető.

$$\text{Egy adott fehérje oldatra: } \Theta_M = F_{\text{Hélix}} \times \Theta_{\text{Hélix}} + 1 - F_{\text{Hélix}} \times C,$$

ahol $\Theta_M \Rightarrow$ a mért átlagos reziduális ellipticitás,

$F_{\text{Hélix}} \Rightarrow$ a hélix formában jelenlévő rész,

$\Theta_{Helix} \Rightarrow$ egy tisztán helikális rendszer átlagos reziduális ellipticitása
 C a β - és random-formák spektrális hozzájárulása (8. táblázat).

8. táblázat

Spektrális referencia adatok		
nm	Θ_{Helix}	C
210	-22462.8	-3509.26
213	-20973.8	-3883.82
216	-20746.8	-3805.00
218	-21354.8	-3658.07
220	-22011.6	-3416.11
222	-22386.6	-3102.13
224	-21895.9	-2785.12
227	-19249.0	-2315.92
229	-16277.7	-2106.22
231	-12865.9	-1871.88
234	-8451.21	-824.754
237	-4642.19	-402.117
240	-2255.45	-215.899

Ahhoz, hogy egy híg, fényszóró minta (membrán szuszpenzió) CD-spektrumát a lapulási effektusra korrigálhassuk az eredeti minta CD-jére és szolubilizált állapotában mért abszorpciós spektrumára van szükség:

$$\Theta_{Mért} = Q_B \times F_{Helix} \times \Theta_{Helix} + 1 - F_{Helix} \times C \text{ , ahol}$$

$Q_B \Rightarrow$ hullámhosszfüggő lapulás-korrekciós faktor.

Attól függően, hogy a részecskéket milyen geometriai modellt rendelünk a lapulási faktor az alábbi függvényekkel írható le:

1.) Köbös modell: $Q_B = e^{-\alpha}$

2.) Gömb modell: $Q_B = \frac{2}{\alpha} \times T_P - e^{-\frac{3\alpha}{2}}$

$$T_P = \frac{8}{9\alpha^2} \times \left(1 - \left(1 + \frac{3}{2}\alpha \right) \times e^{-\frac{3\alpha}{2}} \right)$$

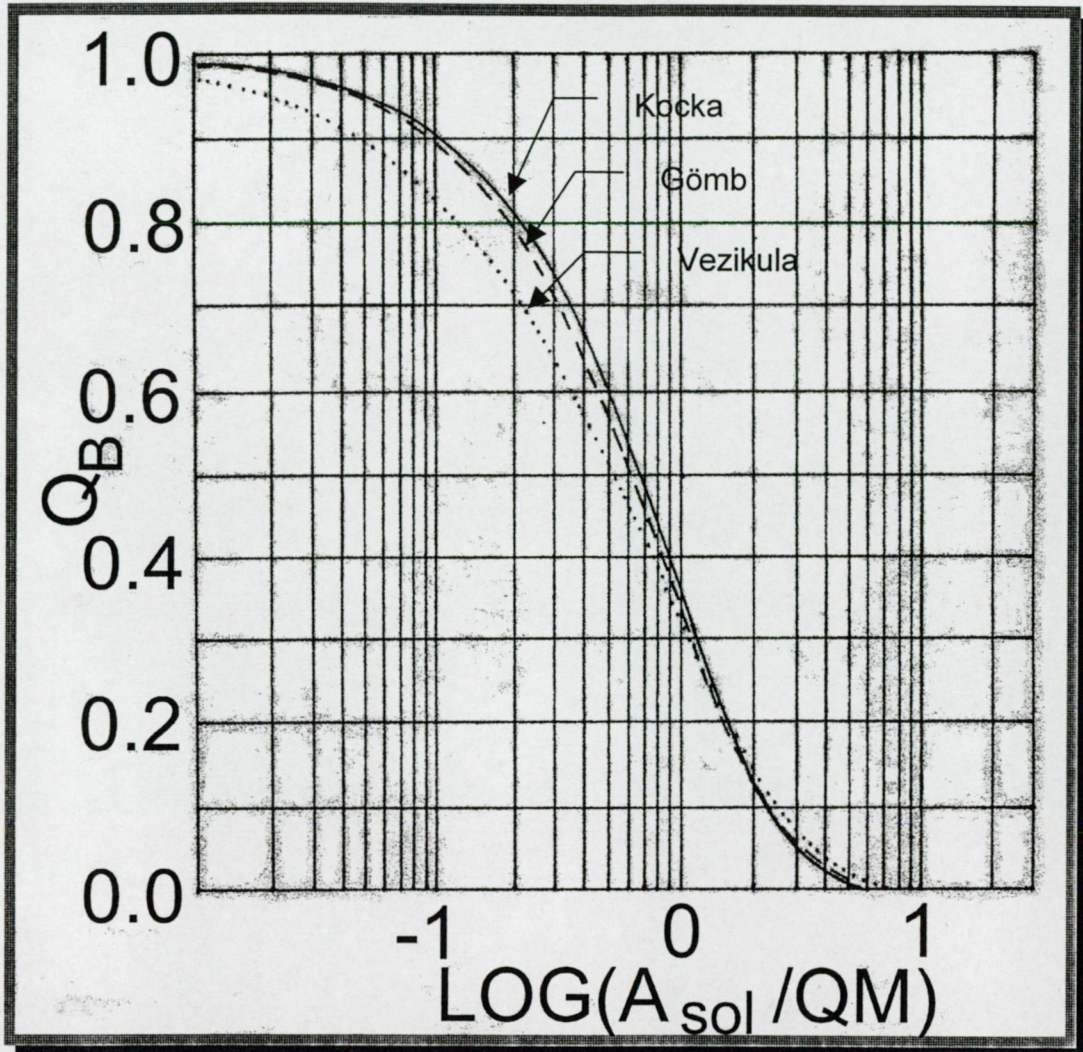
3.) Gömbhély, vagy vezikula modell {92}:

$$Q_B = e^{-\left(\frac{\alpha}{2}\right)} - \frac{\alpha}{2} \times \int_{\frac{\alpha}{2}}^{\infty} \frac{e^{-y}}{y} dy$$

- $Q_B \Rightarrow$ lapulási együttható (flattening coefficient, 21. ábra)
- $T_P \Rightarrow$ átlagos részecske átmérő (22. ábra)

21. ábra

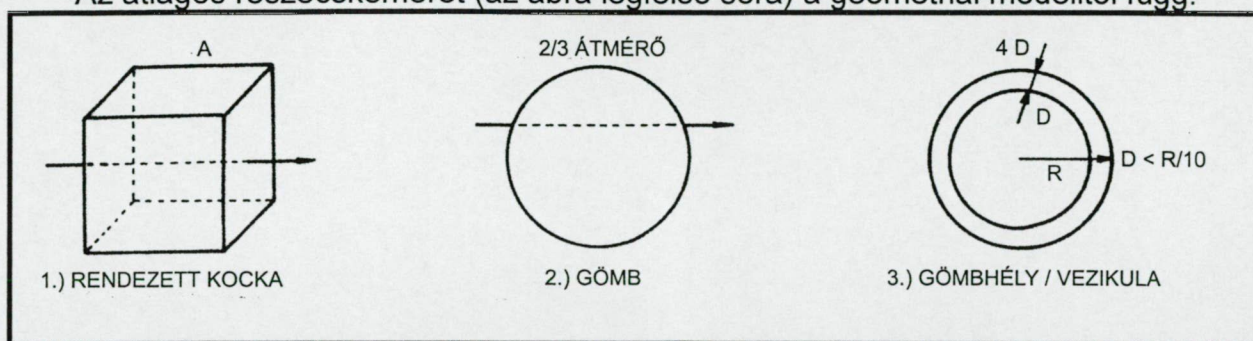
A lapulási korrekciós faktor (Q_B) értéke a részecske geometriától és a $\log(\alpha)$ értékétől függ (magyarázat a szövegben)



- $\alpha \Rightarrow$ optikai elnyelés az átlagos részecske átmérő mentén
- $\alpha = \frac{A_{\text{sol}}}{Q \times M}$
 - ♦ $A_{\text{sol}} \Rightarrow$ optikai abszorpció szolubilizált állapotban
 - ♦ $Q \times M \Rightarrow$ a részecskék átlagos száma a fényútban
 - ♦ $Q = \frac{v}{V}$, ahol
 - ♦ $v \Rightarrow$ a részecskék teljes térfogata (vezikulák esetén csak a gömbhéj)
 - ♦ $V \Rightarrow$ a szuszpenzió teljes térfogata
 - ♦ $M = \frac{\text{optikai úthossz}}{T_P}$

22. ábra

Az átlagos részecskeméret (az ábra legfelső sora) a geometriai modelltől függ.



Gyakorlatban a minták peptid-, vagy fehérjetartalmát biuret és/vagy Folin reakciókkal mértük és a koncentrációt 200 $\mu\text{g/ml}$ -re állítottuk. A CD méréseket (Jasco 40c készüléken) 1 mm-es kvarc-küvetében végeztük szobahőmérsékleten, 2 $\text{m}^{\circ}/\text{cm}$ érzékenységgel, 16 sec időállandóval. A mintát a fotoelektronsokszorozóhoz a lehető legközelebb helyeztük el, hogy szórt fényt (lehetőség szerint) ne veszítsünk. Az abszorpciómérés az *Anizotrópia faktor* alfejezetnek megfelelően történt (33. oldal). A CD-spektrométert D-kámforszulfonsavra kalibráltuk {93}. A molekulárisan diszpergált állapotot 80%-os 2,2,2,-trifluoroetanollal állítottuk elő. Ellenőrzésképpen asolectin vezikulákba ágyazott poli-lizin szerkezetváltozásait használtuk (9. táblázat). Az anyagok Sigma gyártmányúak voltak. Ultrahangozás után a vezikulákat centrifugáltuk, különböző pH-jú foszfát-pufferrel mostuk, a fenti leírás lépéseit megelőzően. Állandó hőmérsékleten a poli-lizin különböző konformációs állapotokban létezhet a pH-tól függően. 11-es pH felett, a töltetlen ϵ -aminocsoportok nagy aránya miatt a helikális struktúra döntő mértékben preferált.

9. táblázat

A pH-hatása asolectin vezikulákhoz kötött poli-lizin szerkezetére

pH (peptid = poli-lizin)	% hélix (\pm std.dev.) ... [% β -szerkezet]*	
	lapulási korrekció nélkül	lapulási korrekció után
11.7	41(2)	79(6)** ... [0]
6.46	30(2)	40(6) ... [29.6]

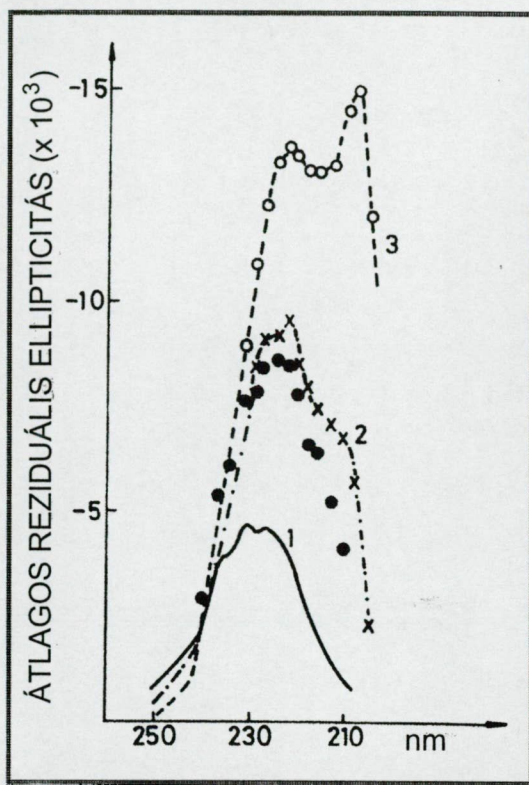
* Siegel {91} szerint a β -tartalom az α -hélix aránnyal predeterminált, a [β -frakció] = $0.583 - 0.729 \times [\alpha\text{-helikális rész}]$ összefüggésnek megfelelően.

** A foszfatidilkolin fejecsoportok és az ϵ -aminocsoportok kölcsönhatása miatt nem lehetett teljes helikális konverziót elérni.

A 23. ábrán mitokondrium szuszpenzió mutatjuk be a lapulási effektus hatásait, a molekulárisan diszpergált állapot spektrumát és a korrigált spektrumot.

23. ábra
Mitokondrium preparátumok CD-görbéi

- 1 Intakt mitokondrium szuszpenzió, a lapulási effektus a görbét „összenyomja”. A korrekció nélkül számítható hélix tartalom 19%.
- 2 Submitokondriális részecskék (ultrahangkezelés után a részecskeméret csökken, a jel nő)
- 3 Szolubilizált (molekulárisan diszpergált) állapot, amit 80% trifluoroetanollal képeztünk. Ez a maximálisan elérhető (58%) hélix tartalmat adja.
- 4 Lapulási effektusra korrigált értékek (●), köbös modell alapján. A számított hélix tartalom 43%.

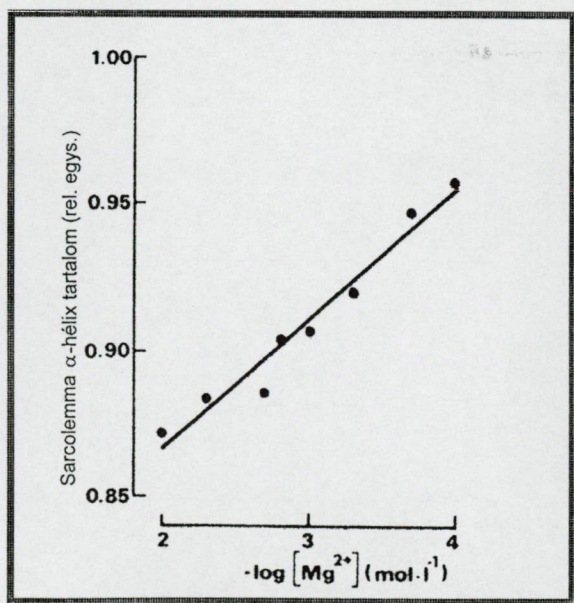


A marha szív-mitokondriumokat izotóniás oldatban (120 mM KCl, 2 mM Tris.HCl. pH= 7.4), differenciál centrifugálással állítottunk elő.

A fentiekben részletesebben ismertetett eljárást több megjelent, szív-sarcolemma ATP-ázokkal kapcsolatos publikáció {92, 94, 95} alaptechnikájaként használtuk. A módszer alkalmas arra, hogy frakcionált membránrendszerek fehérjéről összehasonlítható adatokat kaphassunk különböző ionok (24. ábra), esetleg energetikai változások hatására.

24. ábra

Magnézium indukálta enzimatis és szerkezeti változásokat megfigyelve patkány szív-sarcolemma membránkötött fehérjei vonatkozásában {95}, ATP nélkül 0.1-10 mM Mg^{2+} -skálán α -hélix tartalom csökkenés figyelhető meg. ATP-jelenlétében azonos Mg^{2+} koncentrációk az Mg^{2+} -függő ATP-áz aktivitását növelik, a hélix tartalom csökkenésével összefüggésben kvantitatív alapon, $\alpha_{Hélix} = 0.779 - 0.044 \times \log[Mg^{2+}]$, $r = 0.981$ ($p < 0.01$), $pH_{Tris} = 7.4$, a görbe pontjai 6-8 kísérlet átlageredményeiből adódnak. **A Mg^{2+} -okozta másodlagos szerkezeti modulációnak lényeges szabályozó szerepe van az ATP-áz aktivitásában.**



BIOTECHNOLÓGIAI ALKALMAZÁSOK

Látszólag távolinak tűnhet a korábbiakban leírt elméleti ismeretek gyakorlatban való alkalmazhatósága, pedig érdekes és fontos lehetőségeket rejtenek {96}.

D-aminosavak beépítése peptid-természetű hatóanyagokba {97}

A hetvenes évek elején, az endorfinok és az enkefalinok felfedezésével a morfin természetes megfelelőjeként mellékhatásoktól mentes fájdalomcsillapító megtalálását is komolyan remélték. Hamar kiderült, hogy az enkefalinok intravénásan nem alkalmazhatók, mert a *tirozin-glicin-glicin-fenilalanin-leucin*, vagy *-metionin* pentapeptid hatás szempontjából fontos tirozinja, a glicinnel képzett peptidkötés enzimatis hasításával, 1-2 perc alatt leválik és a maradó tetrapeptid hatástalanilag inaktív. Az említett probléma - szintetikus úton a második pozícióba nem-természetes aminosav beépítésével - megoldható, mert az inaktiváló enzim a tirozin-D-aminosav peptidkötést nem hasítja, intravénásan beadva több óráig stabil. Előnyös mellékhatásként a kettes pozícióban megjelenő D-aminosav, a természetes enkefalinokat alapul véve, hatáserősségben sokszoros növekedést eredményezett. Sajnos az is kiderült, hogy hosszabb-rövidebb idő alatt az új anyagokkal szemben is kialakulnak a morfinra jellemző mellékhatások. Nem reménytelen az egyes mellékhatásokért felelős szerkezeti elemeket azonosítani, és esetleg úgy módosítani, hogy csak a fájdalomcsillapító hatás maradjon. A budapesti Gyógyszerkutató Intézetben került kifejlesztésre a GYKI-14238 jelű anyag (tyr-D-met-gly-phe-pro-amid), ami a gyakorlatban hexapeptidet modellez és évek múltán törzskönyvezve lett. Összetett szerkezet-hatás vizsgálatokban (QSAR) vettünk részt. A peptideket Bajusz Sándor (GYKI) szintetizálta, illetve R.C.A. Frederikson-tól (Eli Lilly, Indianapolis) kaptam egy különleges jelöltet (metil-csoporttal a negyedik és ötödik aminosav közötti peptidkötésen), amit "hozzászokástól" mentesnek jeleztek az előzetes mérések alapján. 25 mg érkezett a jelzett peptidből, amit elfeleztünk a Gyógyszerkutató Intézettel (GYKI), ahol Székely József végzett állatkísérleteket az anyaggal, a kis mennyiség miatt erősen korlátozott számban. Egereken valóban nem volt kimutatható hozzászokás a szerhez, míg egyéb hatásai a GYKI-analógokkal

összevethetőek voltak. Az összehasonlító peptidekhez a hozzászokás tünetei is jelentkeztek. A Frederikson-peptid másik 12.5 mg-ját QSAR vizsgálatokban használtam fel.

Bioszenzor morfinszerű vegyületek kvantitatív vizsgálatára

Általánosan elfogadott bioszenzor séma 3 egységet tartalmaz:

(1) biológiai érzékelő elem → (2) jelátalakító → (3) jelfeldolgozó egység

Az (1) érzékelőnek szelektívnek kell lennie a mérendő analitikumra, összetett mintában is. A (2) jelátalakító szerepe, hogy az érzékelőn létrejövő fizikai, vagy kémiai változást mérhető jellé, leggyakrabban elektromos jellé alakítsa, ami arányos a mérendő analitikum koncentrációjával.

QSAR méréseinkhez az alábbiakban vázolt szenzorrendszert állítottuk össze.

A (1) biológiai érzékelők:

a.) tengeri malac vékonybél, plexus myentericus Auerbach

b.) egér ondóvezeték (vas deferens)

Kis frekvenciájú elektromos pulzusokra kémiai transzmitter anyagok (az Auerbach-köteg esetén acetilkolin, az egér ondóvezetékén noradrenalin) ürítése váltható ki, amelyre mindkét modell izom-összehúzóddással válaszol. Az izom felé átvivőanyagot tartalmazó idegvégződéseken moduláló idegvégzódések találhatóak, amelyek postsynaptikus membránja a tulajdonképpeni receptor a szenzorrendszerben. Morfinszerű-vegyületek, peptidek hatására a hatáserősségtől, koncentrációtól függően (azonos paraméterekkel rendelkező elektromos pulzusokra) eltérő izomválasz kapható, mivel a moduláló hatás eredményeképpen változik a transzmitter ürítés mértéke. Az összehúzóddások nagysága a mért (modulátor) anyagokra skálázható a vizsgálatokhoz.

A (2) jelátalakító rendszer:

Kettősfalú, üveg mérőedényt termosztáltunk a külső köpenyen 37 °C-os vizet áramoltatva. Az edény ismert térfogatú Szentgyörgyi-Krebs oldattal (pH = 7.4) töltöttük fel, amelyen karbogén-gázt (95 % O₂, 5 % CO₂) buborékolattunk ismételt beállításban. Az állatokból frissen kioperált preparátumok két végére felfüggesztő hurkokat helyeztünk el, amelyek egyik végét a mérőedény alján rögzítettünk a kialakított kampóba akasztva, míg a másik véget az edény fölé rögzített nyúlásmérőbéllyeghez kapcsoltuk. Jelgenerátorból a tápoldatba vezetett

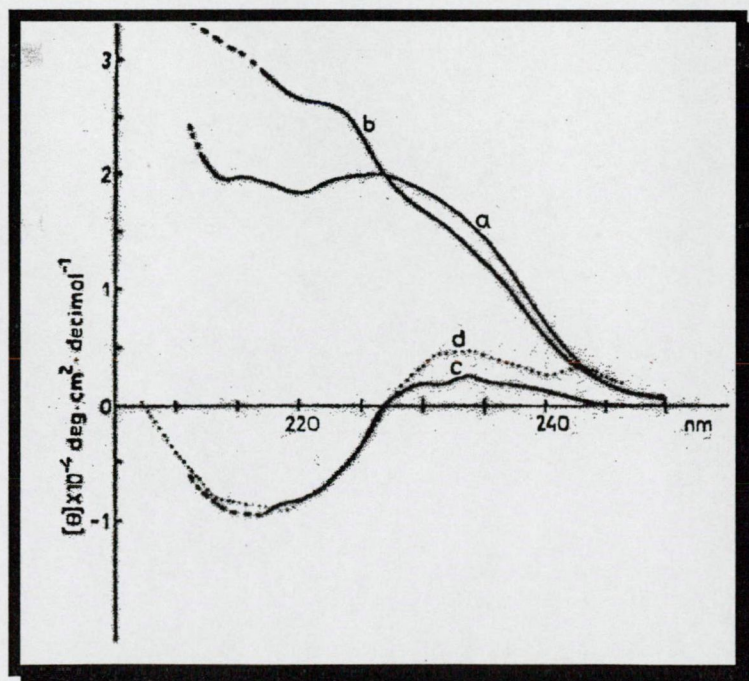
négyszögjelek váltották ki az (összeállításban izometriás jellegű) összehúzódásokat. A nyúlásmérőbéllyeg ellenállásváltozásait hídkapcsolásban, erősítővel alakítottuk elektromos jellé. A vizsgált anyagokat a tápoldat ismert térfogatába mértük. A munkaoldattal azonos mosóoldat használatával a rendszer frissíthető, ismételt, vagy új mérések végezhetőek a preparátumokkal 8-10 órán keresztül, ha durva (irreverzibilis) hatások nem történnek időközben. Az összeállítás nem a legegyszerűbb, de szelektivitása, linearitása kiváló és megbízhatóan jól működött.

Enkefalin-analógok (D-aminosav²) QSAR-vizsgálata {97}

Enkefalin-analógok relatív szerkezeti merevségét hasonlítottuk össze két eltérő biológiai modellen mérhető biológiai aktivitásával. Elméleti és kísérleti adatok szerint enkefalin-szerű pentapeptidek random és ún. β -formában (egyetlen intramolekulás, hidrogén-híd stabilizálta kanyarulattal) létezhetnek. A CD-spektrum távoli ultraibolya tartományában az enkefalinok nagy pozitív értéket adnak a tirozin és fenilalanin gyűrűk jelenléte miatt. A szerkezeti paramétert az adott analógok vizes oldatában mérhető (10 mM/l Tris HCl, 100 mM/l KCl, pH =7.0, $C_{analóg} \cong 60 \mu\text{g/ml}$, $l = 1 \text{ cm}$) cirkuláris dikroizmus (CD) adatokból nyertük (25. ábra), míg a biológiai aktivitást az előző fejezet rész szerint tengerimalac vékonybél, illetve egér ondóvezeték preparátumokon.

25. ábra

- a. A metionin-enkefalin CD-spektruma
- b. A Tyr-Gly-Gly és a Gly-Gly-Phe tripeptidek spektrumainak összege
- c. Az a és b görbék különbsége
- d. β -kanyarulat spektruma (Chen és munkatársai szerint)



A CD-készülék 225 nm-en, D-kámforszulfonsavra kalibrált, Jasco 40c típusú volt. A CD eredményeket moláris ellipticitásként adtuk meg, $\Delta\epsilon$ [fok \times cm² \times decimol⁻¹ / 3300]. Chen és munkatársai koncepcióját elfogadva, a mért $\Delta\epsilon$ értékeket a $\Delta\epsilon_{random}$ és $\Delta\epsilon_{\beta}$ hozzájárulások lineáris kombinációjaként kezeltük. Az 25. ábrán a tripeptid-spektrumokkal történő korrekcióval a random hozzájárulás nagyobb részét vontuk ki a mért $\Delta\epsilon$ -ból. Továbbiakban a korrigált $\Delta\epsilon$ -értékeket hidrogén-híd stabilizálta molekula merevség relatív mértékeként használjuk. Az alábbi, 10. táblázatban foglaljuk össze az eredményeket.

10. táblázat
A metionin-enkefalin és öt szintetikus analóg CD és biológiai hatás adatai

Peptid	$\Delta\epsilon_{225}$	GPI lg ID ₅₀ [M]	MVD lg ID ₅₀ [M]
<i>D – Ala², Phe⁴(N – CH₃), Met⁵NH₂</i>	-5.703	-7.777	-8.428
<i>D – Met², Pro⁵NH₂</i>	-4.928	-7.699	-7.523
<i>D – Met², Nle⁵OH</i>	-2.161	-7.398	-9.222
<i>D – Ala², Pro⁵NH – amil</i>	-2.014	-7.046	-6.824
Metionin-enkefalin	-1.106	-6.699	-8.125
<i>D – Ala², Pro⁵OH</i>	-0.907	-6.675	-6.456

Magyarázat:

- $\Delta\epsilon_{225} = \Delta\epsilon_{225}^{minta} - \Delta\epsilon_{225}^{YGG} + \Delta\epsilon_{225}^{GGF}$
- $\Delta\epsilon_{225}^{YGG} + \Delta\epsilon_{225}^{GGF} = 6.236$
- YGG = tirozil-glicil-glicin, GGF = glicil-glicil-fenilalanin
- GPI = tengerimalac vékonybél, MVD = egér ondóvezeték
- A peptidek opioid agonista aktivitását az 50%-os gátláshoz szükséges dózis (ID₅₀) jellemzi, 4-40 független meghatározás alapján.

Szoros korreláció mutatkozik a tengerimalac vékonybél preparátumon mért ID₅₀ és a hatóanyagokra meghatározott $\Delta\epsilon_{225}$ értékek között:
lg ID₅₀ = $\Delta\epsilon_{225} \times 0.22 - 6.62$, a lineáris korrelációs együttható, $r = 0.94$.

Az egér ondóvezetékén nem adódott hasonló összefüggés ($r = 0.30$).

Következtetésként levonható, hogy kísérleteinkben kétféle peptid-receptor kölcsönhatás különböztethető meg. Az egyiket a tengerimalac vékonybél testesíti meg, amelyhez a merevebb, opioid-alkaloid jellegű (oldatban nagyobbrészt intramolekuláris hidrogén-híddal stabilizált) peptid-szerkezeteknek nagyobb az affinitása, biológia aktivitása. A másik receptor típus esetén, amelyet az egér ondóvezetékén is feltételezünk, a peptid C-terminális aminosavának minősége meghatározó, ami nem látszik fontosnak a vékonybélen lévő receptor esetében. A lényegét egy mondatban összefoglalva: a tengerimalac vékonybelén lévő (μ -)receptorok a merev opioid-jellegű szerkezeteket kedvelik inkább, míg az egér ondóvezetékén azonosított (δ -)receptorok a flexibilis és merevebb struktúrákkal is hasonlóan hatnak kölcsön.

Biológialag aktív fehérjeszegmensek azonosítása

HIV-1 gp41 immunkémia {98}

HIV-1 fertőzés folyamán több vírusfehérje ellen termelődik ellenanyag, leggyakrabban a gp120 és gp41 köpenyfehérjék ellen. Ezek megismerése diagnosztikai módszerek fejlesztése, esetleges megelőzés (ezen az úton egyre kevésbé valószínű), AIDS-patogenezis és a HIV-1 elleni immunválasz megértése szempontjából is fontos. A gp41 fehérje amino-vége gyakorlatilag minden HIV-1 pozitív szérummal reagál. A finn Labsystems Oy munkatársaival végzett munka keretében részletesen elemeztük a gp41-et és újdonságként egy 15 aminosavból álló peptidet (A15) találtunk, amely normál esetben a membránban van, de szintetikus formában erősen immunaktív, más konvencionális módszerekkel azonosított HIV-1 pozitív szérumokkal. Egész vírust, vagy vírusköpenyt használó tesztekkel ez a kölcsönhatás nem vizsgálható. A kísérletekben 2 peptidet használtunk, az A15-öt az előbbiek szerint és az ún. B18-at kontrollképpen, a szilárdfázisú szintézis sajátosságaként egy-egy ciszteinnel az N-terminális irányban meghosszabbítva a természetes szekvenciákat:

A15 (gp41 599-613) SGKLICTTAVPWNAS(C)

B18 (gp41 645-662) LIEESQNQQEKNEQELLE(C)

Az **A15**-peptidet a C-terminális ciszteinen keresztül Pharmacia AH-Sepharose-4B-re kötöttük, majd ennek segítségével 10 erősen pozitív HIV-1 páciens, összesen 1.5 ml szérumból tisztítottunk **A15**-antitesteket, amelyek immunoblott, radio-immunoprecipitációs és immunfluoreszcenciás vizsgálatokhoz voltak szükségesek.

Peptidalapú EIA mérésekhez (26. ábra) 0.5 μ g szintetikus peptid 100 μ l PBS-ben, mint BSA konjugátum került a mérőhelyekre (8 x 12, polisztirol ELISA lap), majd az inkubálás szobahőmérsékleten egy éjszakán át történt. 100 μ l vizsgálati szérum 1:40 arányban 1% BSA-val és 0.02% Tweennel kiegészített PBS-el hígítva került a mérőhelyekre, majd 37 °C-on 1 órán át inkubálásra. A mosás vizes, 0.02%-os Tween 20-al történt. Az emberi IgG antitestek jelenlétének kimutatása disznóban termeltetett (Labsystems) anti-humán IgG-alkalikus foszfatáz konjugátummal történt. A szeropozitivitási határérték 1000 HIV-1 antitest-negatív véradó mintái statisztikailag 2σ -szinten szignifikáns átlagának kétszereseként került megállapításra. 135 HIV1 pozitív szérum mindegyike pozitívnak adódott az előbbi (**A15**-peptid) tesztrendszerrel, míg az 1000 negatív minta egyike sem lett tévesen pozitív, tehát a tesztre 100%-os specificitás mondható ki. A tisztított **A15**-antitestpreparátum csak az **A15**-peptid alapú tesztben volt pozitív, míg egész vírus, illetve **B18**-peptid tesztek negatív eredményt adtak.

26. ábra

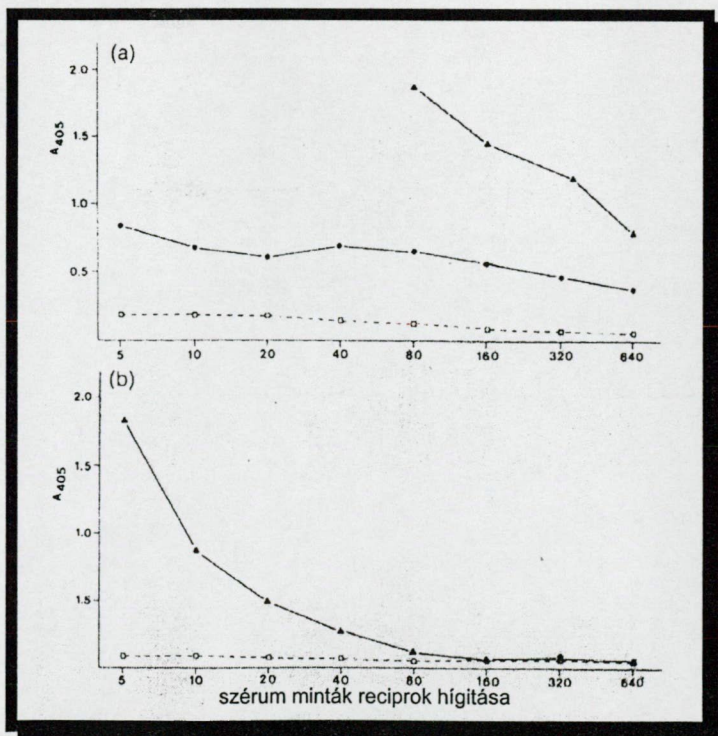
(a) Gyűjtött, nem frakcionált HIV-1 pozitív szérum reaktivitása

● egész vírus EIA-tesztben,
▲ **A15**-peptid EIA-tesztben.

A15-peptid EIA-tesztben a <1:80 titerek már nem mérhetően nagy jelet adtak.
□ HIV-1 negatív minták nem reagálnak a peptid-EIA során.

(b) Affinitás kromatográfiával tisztított **A15**-antipeptid-immunglobulin frakció reaktivitása

▲ **A15**-peptid EIA-tesztben, míg
□ **B18**-peptid, vagy egész vírus EIA-tesztben nincs reakció.

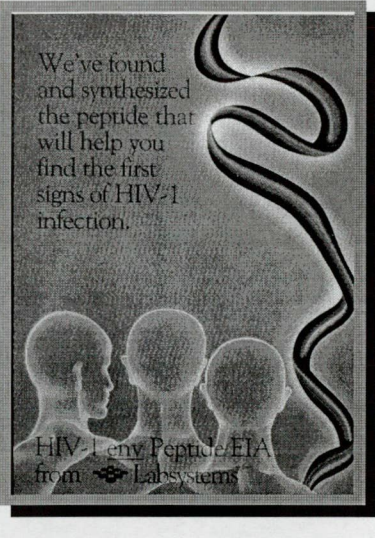


Itt még csak feltételeztük, de későbbi kísérletek igazolták, hogy a HIV-1 okozta betegség előrehaladtával az egyébként membrántakart szegmensek ellen antitestek jelennek meg a betegekben. Ilyen szakaszok elemzése hozzájárul az aktuális státusz leírásához. Elemzéseink alapján igazoltan megbízható diagnosztikai kett állt össze.

Az első peptid alapú HIV-1 teszt

A finn Labsystems Oy terméké fejlesztette a leírt rendszert

We've found and synthesized the peptide that will help you find the first signs of HIV-1 infection.

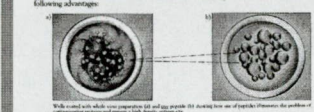


HIV-1 env Peptide EIA from Labsystems

Synthetic peptides take HIV-1 diagnostics that vital step forward.

The first EIA kit for detecting HIV-1 antibodies used whole virus preparations, which resulted in cross-reactivity and sensitivity. Recombinant DNA technology has led to the development of so-called secreted protein genes, which are based on polypeptides of the main HIV-1 protein. The problem remained, however, of contaminating proteins adversely affecting the specificity of the assay.

Labsystems has taken the work a vital step forward by using a short and synthetic peptide which is a good antigenic determinant. Using computer programs and a panel of synthetic peptides we found the best fit to the main HIV-1 protein. This peptide is the only one which gives a positive and clearly visible result in the test.



Higher specificity – Our peptide is derived from a highly conserved region of gp41 in HIV-1. Use of a synthetic peptide eliminates false positive due to cellular sequences.

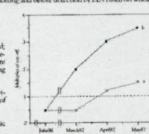
Higher sensitivity – Antibodies can be detected at a level up to three fold greater than the cut-off level at the time seroconversion is observed by immunoblotting and before detection by EIA based on whole virus preparations.

Versatility – Labsystems' peptide kit is equally suitable for screening and diagnostic purposes.

Easy to use – No new methodology is required, the test is a conventional sandwich EIA. No sample purification is required. Using a multi-channel antigen reader simplifies the color reaction and makes reading easier.

Absolute user safety – Using peptides instead of viruses to coat the Microtiter® eliminates all danger of infection.

Reliability – Manufacturing kits based on synthetic peptides results in minimum variation between lots.



Characteristics of Labsystems' synthetic peptide

- based on a sequence of transmembrane protein gp41
- HIV-1 specific – derived from a conserved region in different HIV-1 isolates
- derived from a synthetic peptide which is a good antigenic determinant
- highly immunoreactive against HIV-1 antibody positive sera

HIV-1 env Peptide EIA Test Kit
(cat. no. 6110-300)

Kit contents

Peptide-coated Microtiter® 12x8 wells	Anti-human IgG-AF conjugate
Sample diluent	Solution B
Negative control serum	gPpF substrate
Positive control serum	Washing solution
Conjugate diluent	Incubation covers

Test procedure

- Pipette 100 µl of each of sample diluent and positive and negative control sera in duplicate into the Microtiter® wells.
- Pipette 90 µl of sample diluent and 10 µl of serum or plasma into the wells.
- After incubation for 60 min. at +37°C wash the wells.
- Pipette 100 µl of diluted conjugate into the wells.
- After incubation for 30 min. at +37°C wash the wells.
- Pipette 100 µl of substrate solution into the wells.
- After incubation for 15 min. at +37°C stop the reaction by adding 100 µl of 1N NaOH into the wells.
- Read the absorbance at 450 nm.

A teszt klinikai megbízhatóságát igazolták. A továbbfejlesztett változat forgalomba került.

„Idegesítő” peptid a laminin szerkezetében {99}

A laminin extracelluláris multidomén-szerkezetű mátrix-fehérje. A szerkezeti feladatokon túl szerepe van az agyfejlődésben és idegregenerációs folyamatokban. Monoklonális antitestek használatával valószínűsítették, hogy a natív laminin neurit növekedés elősegítő doménjének a heparin-kötő doménben, vagy annak közelében kell lennie. Proteolitikus fragmensekkel igazolták, hogy egyesek segítik csirke perifériális neuronok kapcsolódását. A B1-láncon, a P1-fragmensre térképezték az általános sejt-kapcsolódásért felelős domént. Csaknem biztos, hogy több szakasz van a laminin felületén, ami a sejtek kapcsolódásának helyéül szolgál, illetve ugyanez valószínűsíthető a neurit növekedés szabályozására. Részletesen elemeztük az egér laminin B2-láncának cDNS {100, 101} szekvenciájából levezetett elsődleges szerkezetéből kikövetkeztethető sajátos szegmens tulajdonságokat. Elemzési stratégiánkat és a használt alapvető módszereket korábban ismertettük

(40-49 oldal). Itt fokozott szerepet rendeltünk a vizsgált szakaszok becsült másodlagos szerkezetéből adódó eredő hidrofobicitási momentumának. α -helikális szegmensben sikerült egy szelektív hatású decapeptidet azonosítani, ami p20-ként azonosított: **Arg-Asn-Ile-Ala-Glu-Ile-Ile-Lys-Asp-Ile**. Ez a peptid szimulálja a natív laminin neurit növekedést elősegítő aktivitását.

Szövettenyészetben, a p20 szintetikus megfelelőjével igazolódott, hogy centrális és perifériális neuronokra egyaránt hat. A neuronok, újszülött egéragyból, vagy egérembriók perifériális idegrendszeréből származó tenyészetekben erőteljes neurit-növekedéssel válaszolnak natív lamininre és a p20-ra egyaránt. További bizonyíték a peptid sajátos biológiai hatására, hogy patkány cerebelláris neuronok natív laminint tartalmazó rendszerben történő tenyésztése esetén a p20-nak (1-5 μ M) kompetitív hatása van: akadályozza a neuronok letapadását és a neurit növekedést. Ez utal arra is, hogy a p20-at a neuronok laminin receptora felismeri és köti. Magasabb koncentrációban a p20 neurotoxikus (>50 μ M). Ugyanilyen tenyészetekben a p20-at albuminhoz (BSA) kötve és laminin helyett alkalmazva a peptid a natív lamininhez viszonyítva 60%-ban hatásos a neurit növekedés viszonylatában. Mivel a peptid nem teljesen veszi át az intakt laminin szerepét valószínű, hogy más laminin-domén(ek) is részt vállal(nak) a kölcsönhatásokban. Felnőtt egerek cerebrospinális folyadékában nanomoláris nagyságrendben van jelen oldható laminin, ami agyi proteolitikus folyamatok révén kerülhet oda és lehet, hogy ennek természetes befolyása van funkcionális, és/vagy patológiás folyamatokra. A p20-nak lehet gyakorlati jelentősége, mivel 10^{-7} mólnyi mennyisége is, kísérletileg bizonyítottan, stimuláló hatású a neurit növekedésre.

Összefoglalás

Az optikai tisztaság az élet alapvető feltétele és megkülönböztető tulajdonsága, ami a genetikai kód mellett közös minden földi élő szervezetben. Az élettelen és élő közötti egyik leglényegesebb választóvonal a tükörszimmetria sérülése az élő organizmusokban: az élettelenekre jellemző jobbos-balos, D- és L-izomer párokból az élőben csak az L-aminosavakat, illetve D-cukrokat találunk. Lehet, hogy az evolúció során a mai szimmetria-viszonyoknak megfelelő állapotok előnyösebbek voltak, a ma nem-természetesnek mondottaknál, de az is lehet, hogy fizikai-kémiai kölcsönhatások tolták el az egyensúlyt a mai élőknél megfelelő irányba.

Pozitron annihilációs kísérletekben a triplet pozitronium képzés valószínűségét D-aminosav izomerekben nagyobbak találták. Az ebből következő, D- és L-izomerekben eltérő spinmegoszlás elméleti magyarázatára született a helikális elektrongáz modell. Az elmélet szerint optikai antipódokba épített β -bomló izotóp eltérő bomlási állandóiból az optikai izomerek különbségét leíró w , dimenzió nélküli érték határozható meg. Kísérleti bizonyításra feniletilamin és tirozin optikai izomer-párokat jeleztünk Br^{82} -vel. KBr^{82} szolgált kontrollként, amelyben 35.61 ± 0.02 óra felezési időt határoztunk meg. Az izomer-molekulákból nyert adatokból w felső értékére tudunk becslést adni: $w \leq 1.5 \times 10^{-5}$, amiből ≤ 3.36 % spinpolarizáció vezethető le optikai izomer-párokra.

Kétféle gázkromatográfiás módszert használtunk aminosav optikai izomer arányok meghatározására: (1) L-mentollal állítottunk elő a D- és L-aminosav-észtereket, választottunk el szimmetrikus megosztó-fázison, illetve (2) N-trifluoroacetyl-aminosav-metil- és i-propil-észterek formájában optikailag aktív diamid fázison (N-lauril-L-valil-t-butylamid). Az élőben az optikai tisztaság fenntartása energiaigényes folyamat, tehát a halállal megkezdődik az entrópia növekedés, az optikailag aktív anyagok racemizálódása. Az aminosav racemizáció interkonverzióval történik úgy, hogy az optikailag tiszta aminosavak α -protonjának leadásával keletkező planáris karbanionok protont fogadhatnak a sík mindkét oldalán, tehát L- és D-aminosavak is létrejöhetnek. Egy aszimmetria centrumot tartalmazó aminosavaknál a folyamat elsőrendű. Aminosav racemizációs adatok alkalmasak paleontológiai, paleoantropológiai, törvényszéki orvosi és patológiai adatok

szerzésére is. Paleontológiában, ha más módszer szolgáltatja a kort, akkor az átlagos paleotemperatúra számítható. Orvosi vonatkozásban bizonyos fejlődési és általában az öregedési folyamatok, bizonyos betegségek, daganatok esetén felszaporodó D-aminosavak jelenthetnek használható információt. Új adat, hogy emberi szemlencsék crystallinjának α A-alegységén belül a 151-es pozícióban található aszparaginsav, a várható értékhez képest sokkal nagyobb mértékben fordulhat elő D-formában. Különleges királis tér léte valószínűsíthető az Asp-151 körül és sztereoinverziós mechanizmus az átalakulásra. Hasonló alapú jelenségek másutt is előfordulhatnak élő szervezetekben, aminek jelentősége nehezen becsülhető meg, mert elvileg letális következményekkel is járhatnak.

Az egyik laboratóriumi evolúciós modell-rendszer a termális peptideké, amelyeket aminosav-keverékek olvadékaiból lehet előállítani. Vulkánok, hévforrások környékén prebiológiai, evolúciós létjogosultságát valószínűsítették. Nem-véletlen kapcsolódási tendenciákat feltételezve glutaminsavat és lizint (1:1) polimerizáltattunk. Tisztítás után egy 9.64 kD átlag molekulasúlyú összetett polimer-keveréket kaptunk, amelyet tripszinnel kezeltünk. A hasítási termékeket ioncserélő vékonyrétegen választottuk el. 5-nél nagyobb tagszámú hasítási termék nem volt kimutatható. Szignifikáns eltérést kaptunk a teljesen véletlen kapcsolódások alapján számított (várt) és a kísérletekben talált hasítási termékek statisztikájában.

16800, különböző (természetes, véletlenszerűen gyűjtött) eredetű kvarc egykristály átlagában 1 százalékkal több balos kristályt találtak, ami a szignifikanciát illetően nem áll ki szigorú statisztikai próbát, de nem is zárja ki, hogy az említett felesleg létezhet. Vizes közegben már korábban kizárták az optikailag aktív ásványok aszimmetria okozó hatását. Megvizsgáltuk, hogy nem-vizes közegben, amilyenek a termális peptidek olvadékai, lehet-e a polimerekben optikai aktivitást generálni. Szintetikus, optikailag aktív kvarc egykristályokból állítottunk elő homokot és ezek jelenlétében polimerizáltattunk glicint és DL-lizint. A keletkezett polimereket tisztítottuk és optikai aktivitásukat a Kuhn-féle anizotrópia faktorról kívántuk jellemezni, de a szimmetrikus kontrollokhoz képest nem kaptunk eltérést, tehát kizártuk az optikailag aktív kvarcok aszimmetria okozó szerepét. Legalsó méréshatárunk az anizotrópia faktorra 3×10^{-8} volt, amihez technikailag meg kellett oldani, hogy a cirkuláris dikroizmus mérésére szolgáló berendezéssel az optikai abszorpció egyidejűleg legyen meghatározható, de sikerült a rendszert lineáris dikroizmus mérésére is alkalmassá tenni és az új megoldást szabadalmaztatni.

Megvizsgáltuk, hogy enzimműködésre specializálódott fehérjékben aminosav-szomszédok, illetve távolabbi párok vonatkozásában a véletlen alapon várható eloszlástól milyen eltérések adódnak. A közvetlen párokat illető kivételek két nagy csoportba sorolhatóak: az átlagnál sokkal gyakrabban előforduló párok csoportja, illetve a másik végletet azok képezik (33 pár), amelyek egyáltalán nem fordulnak elő az adatbázisban.

Az elméleti megfontolásokon túl, vagy egyidejűleg több kísérleti következtetést is levontunk fehérjék szerkezetére és működésére vonatkozóan. Membránba ágyazott fehérjék cirkuláris dikroizmus spektroszkópai módszerekkel történő szerkezetvizsgálata több zavaró tényező miatt nehéz. A leglényegesebb spektrumtorzító hatás az optikai abszorpciós adatokat kisebbsíti, a spektrumot ellapítja. Ennek oka, hogy híg szuszpenziókban az elemi fény-nyalábocskák eltérő számú részecskével találkozhatnak. Módszert ismertettünk ennek az ún. lapulási (flattening) hatásnak korrekciójára, aminek révén membránfehérjék szerkezetvizsgálata lehetségessé válik. Három, a dolgozatban leírt példából egy: patkány szív-sarcolema Mg^{2+} -ATPáz szerkezetének és működésének Mg^{2+} -koncentráció függés vizsgálata alapján a Mg^{2+} -okozta másodlagos szerkezeti modulációnak lényeges szabályozó szerepe van az ATP-áz aktivitásában.

A morfinnal analóg hatású természetes penta-peptidek (enkefalinok: $tyr^1-gly^2-gly^3-phe^4-met^5$, vagy $-leu^5$) közvetlenül nem adhatóak fájdalomcsillapításra, mert enzim-hatásra percekben belül inaktiválódnak. Nem-természetes aminosavak alkalmazása a kettes pozícióban megoldja ezt a problémát, mert az enzim a peptid-kötést nem ismeri fel, sőt (jellemzően) a szintetikus termék biológiai aktivitása is nő. QSAR vizsgálatok keretében két biológiai receptor felhasználásával képeztünk bioszenzort, amellyel szintetikus enkefalin-jellegű molekulák (D-aminosav²) hatáserősségét kvantifikáltuk. A használt molekulák cirkuláris dikroizmus adataiból a molekulák merev illetve flexibilis szerkezetére vonatkozóan számszerűsítettünk értékeket. Az összefüggések elemzésével két, *különböző* peptid-receptor kölcsönhatást írtunk le, amit később megerősítettek az irodalomban.

Egy fehérje aminosav sorrendje önmagában a natív szerkezet kialakulásához szükséges információk jelentős részét tartalmazhatja. Ismert szerkezetekből megismert szabályszerűségek általánosításával és alkalmazásával ismeretlen szekvenciákon is használható becsléseket tehetünk, amelyek modellek, munkahipotézisek alapjául szolgálhatnak. Statisztikai, sztereokémiai és más fizikai-

kémiai megfigyeléseken alapuló összetettebb programot írtunk, amely nagy szabadságot ad a felhasználónak az aminosav-szekvenciák komplex analízisére. Példákon mutatjuk meg, hogy mit tartunk fontosnak, illetve fontosabbnak egy-egy döntés meghozatalánál.

Többek között a HIV-1 gp41-fehérjét analizáltuk az említett programmal, aminek eredménye az ún. A15-peptid, amely HIV-1 fertőzés detektálására alkalmasnak bizonyult ELISA-tesztekben és AIDS-diagnosztikai célú felhasználásra közforgalomba került (Labsystems).

Elemeztük az egér laminin B2-láncát és ebből a p20-ként azonosított dekapeptidről derült ki, hogy szimulálja a laminin neurit növekedést elősegítő hatását (alacsonyabb koncentrációban). A p20 magasabb koncentrációban neurotoxikus.

Néhány elméleti kérdés vizsgálatán túl — lehetséges, időnként igazoltan hasznos — gyakorlati vonatkozásokat igyekeztem összefoglalni dolgozatban, a teljesség igénye nélkül, de a tárgyalt területeken valóban használható információ átadásának szándékával.

SUMMARY

SOME NON-RANDOM TENDENCIES IN (PRE)BIOLOGICAL EVOLUTIONARY PROCESSES AND THEIR USEABILITY IN BIOTECHNOLOGY

The optical purity is a very basic, distinctive feature of the life. In addition to the genetic code, this is common in every living system on Earth. One boundary between the living and lifeless is the mirror symmetry violation in living organisms. In living systems only L-amino acids and D-sugars are present instead of the D-L equilibrium, which is typical for the lifeless Nature and actually this could have been the situation at the start of the (pre)biological evolution. There are two groups of the main possibilities to reach the present biological asymmetry: some kind of basic preference existed in the isomers favoring our recent asymmetry, or starting from real equilibrium, physico-chemical interactions shifted the isomer ratios to the direction of the present living systems.

From positron annihilation experiments the triplet positronium forming probability was found to be higher in D-amino acid isomers than in their mirror image pairs. Out of this, different electron spin-distribution was expected in D- and L-isomers and a helical electron-gas model was developed as possible theoretical background. According to the theory, if a β -radiating isotope is built to D- or L-optical isomer molecules then small decay differences can be expected. From these differences one can estimate a w , dimensionless number representing an intrinsic difference between the isomer-pairs. Experimentally phenyl-ethylamine and tyrosine optical isomer pairs were labelled by Br^{82} and the decay constants were determined in all samples with the highest available precision. In the control KBr^{82} sample the half-life was found to be 35.61 ± 0.02 hours. From the data, obtained from isomer samples, an upper limit estimation was possible: $w \leq 1.5 \times 10^{-5}$, or the measure of the possible spin-polarisation is $\leq 3.36\%$.

Two gas-chromatographic methods were put to practice to determine amino-acid optical isomer ratios: D- and L-amino acid L-menthyl-esters were formed and the isomers separated on symmetric phases, or N-trifluoro-acetyl-amino acid methyl- and i-propyl-esters have been separated on asymmetric diamid (N-lauril-L-valil-t-butylamide) phases. The later method have been found to be better

and more effective. To preserve optical purity in living systems requires energy so after death the entropy starts to increase, among other break-down processes, the racemisation of the optically active materials. The amino acid racemisation is chemically interconversion, when the so called α -proton is deprotonated and a transient planar-hybrid carbanion structure formed. This structure can be stabilized from both side by taking an α -proton substitute so actually the original or mirror image molecule could also be reformed. In case of amino acids with one asymmetric carbon atom this is a first order process. Amino acid racemisation data can practically be used in paleontology, paleoanthropology, forensic medicine, pathology and gerontology, respectively. Sample's age can easily be determined in general, out of the amino acid racemisation parameters. If sample's age is determined by a different method then, based on the actual racemisation, paleotemperature can be calculated. One should be careful on samples to be used because there are possible disturbing factors and these could lead to false results. An interesting news: in older human lenses within the α A-crystalline subunit at the 151st position there is an aspartic acid which was found to be over-racemised. Existence of special chiral space is assumed around it to force stereoinversion. Denaturing the crystalline is damaging the extreme chiral force and quickly resets an almost normal state. This new recognition could also be valid and important in more biological processes (actually the consequences could be lethal in special cases).

The thermal peptides, formed in melted amino acid mixtures are meaning laboratory model systems today but could have (pre)biological evolutionary significance around volcanic areas and thermal springs. Glutamic acid and lysin (1:1) were polymerized, followed by purification and trypsin-treatment. The cleaved products (up to penta-peptides) were separated and compared to the random statistical expectations. Significant non-random amino acid coupling tendencies have been found.

In average of 16800 natural quartz single crystals from different sources a 1 % left-handed surplus was found. In presence of water, optically active quartzes as possible biological asymmetry sources were already ruled out experimentally. We have excluded water and formed thermal polypeptides (starting from glycine and DL-lysine) in presence of synthetic optically active sand. The anisotropy factor was determined by measuring circular dichroic (CD) and absorption spectra. The results

were negative, so *optical activity was not generated*. Technically we have solved to measure optical density with the same optics and electronics as for CD was given. At the same time, possibility of high sensitivity linear dichroism measurements (to study molecular orientations) was realized by a simple but original modification (patented) in the CD-instrument.

From protein-databases enzyme-sequences were selected and a statistical survey was performed concerning amino acid pair relationships. Many differences were found in comparison to random expectations.

Over the theoretical considerations we wanted to measure protein secondary structure by circular dichroism spectroscopy, not only in clear solutions but in membrane-embedded cases too. Due to several disturbing factors this is difficult and practically impossible without proper corrections. In diluted suspensions minimum the so-called flattening effect (due to the special beamlet-particle statistics) should have to be taken to account. We describe how to do the flattening correction of CD-curves in case of three different geometrical models. This method was used in several published work, for instance proving that Mg^{2+} caused secondary structure modulation has essential regulatory role in the rat heart-sarcolemmal ATP-ase activity.

Natural enkephalines ($tyr^1-gly^2-gly^3-phe^4-met^5$, or $-leu^5$) can not be administered for practical use because of their fast enzymatic inactivation. By putting D-amino acids to the second position this problem is off, typically together with increased biological activity. Biosensors, with receptors from mouse vas deferens (MVD) and guinea-pig ileum (GPI), were realized to measure morphine-like biological activities. A peptid molecular rigidity-related value was generated from circular dichroic spectroscopic data. In a QSAR-study on several synthetic enkephaline-like peptides, existence of two different receptor-substrate interaction were realized, actually the receptor on the GPI prefers more rigid structures, while the MVD-receptor acts almost similarly with rigid and flexible molecules.

The amino acid (primary) sequence of a protein holds considerable information on the higher level native structure. Common rules can be deducted and generalized from known protein structures. Sometimes these rules are also applicable on evolutionary questions to answer or get closer to understand. These rules, especially in selected combinations can help structural and functional predictions to make. Based on statistical, stereochemical and other physico-chemical

observations a complex computer program was developed giving extensive freedom to the user.

Among others HIV-1 gp41 membrane-protein sequence was analyzed with the program, mentioned above. A so-called **A15-peptid** (SGKLICTTAVPWNAS) was recognized, found to be useful in ELISA-tests to diagnose AIDS and finally commercialized by Labsystems (Finland).

Out of the mouse laminin B2-chain a decapeptid (**p20**, RNIAEIIKDI) was selected helping neurite outgrowth at lower concentration and found to be selectively neurotoxic at higher concentration.

Of course there is some scatter in the material above but I hope to have my intentions clear for the reader to reach practically useful conclusions of theoretical results coming from the wider field of biological evolution and around the instrumentation used during the experiments.

Köszönetnyilvánítás

A disszertációt a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központja Biofizikai Intézetében, vagy kiküldetésben végzett munkáimból állítottam össze.

Közvetlen munkahelyi Főnökeim, dr. Garai András, akadémikus és dr. Keszthelyi Lajos akadémikus voltak. Garai Andrásnak köszönhetem, hogy Intézetébe dolgozni hívott és figyelmemet a kiralitás és a polarizált optikai spektroszkópiák irányába fókuszálta, de közben az átlagnál több szabad teret hagyott az intuíciónak, míg Keszthelyi Lajostól az átgondoltabb, tervezett kutatás módszereit láttam. Mindketten biztosítani tudták a megfelelő kutatási feltételeket, amit most, évek hosszú során nyújtott segítségükkel egyetemben köszönök meg.

Megköszönöm, minden jó szándékú kollégám együttműködését, segítségét, rokonszenvét, amivel munkámhoz hozzájárultak és azon is túl, amikor barátságukkal kitüntettek.

Dr. Fajszi Csabával és dr. Száraz Sándorral megbeszéltem részkérdéseket. Ezekből is merítettem a dolgozat írásánál, amiért hálás vagyok, Fajszi Csabának kiemelten.

Az SzBK-ban töltött évek alatt, folyamatosan segített a labormunkákban Kissné Domokos Mária, akire mindig lehetett számítani, és amit nagyon köszönök.

Jelenlegi munkahelyem a Szegedi Tudományegyetem, SZÉF, Élelmiszertudományi Tanszéke. A dolgozatot itt állítottam össze. Köszönöm az ehhez nyújtott segítséget.

Utoljára, de nem utolsósorban Családomnak mondok köszönetet, Szüleimnek, Nővéremnek, akik mindig azon voltak, hogy tanulhassak, Feleségemnek és Gyermekeimnek a szeretetért, ami sokszor segített át nehéz időszakokon, a béketűrésért, az aggodásért aszerint, hogy éppen mire adtam okot.

IRODALOM

-
- 1 PAPAGIANNIS MD, *Lehetséges, hogy galaxisunkban csak a Földön van fejlett technológiai civilizáció?* Fizikai Szemle, **6**(1978)210-217
(eredeti: Origin of Life, Proc. of 2nd ISSOL Meeting, Kyoto)
 - 2 <http://cca.arc.nasa.gov/>
 - 3 PONNANPERUMA C, *Exobiology*, North Holland Res. Monogr. **23**(1972)
 - 4 BUHL D, *Origins of Life*, **6**(1974)29
 - 5 CALVIN M, *Chemical Evolution*, Oxford University Press, 1969
 - 6 PONNANPERUMA C, et al. *Chemistry in Space*, Elsevier, (1972)45-82
 - 7 MILLER SL, et al. *J.Mol. Evol.* **5**(1975)59
 - 8 BADA JL, *Origins of Homochirality*, *Nature*, **374**(1995)594-595
 - 9 GOLDANSZKI VI, et al. *Z. Phys. Chemie*, **269**(1988)216
 - 10 MASON S, *The Origin of Chirality in Nature*, *Trends in Pharm. Sci.* January(1986)20-23
 - 11 FISHER GH, et al. *Presence of D-aspartate and D-glutamate in tumor proteins*, *Cancer Biochem. Biophys.* **15**(1995)79-82
 - 12 IMAI K, et al. *Distribution of free D-amino acids in tissues and body fluids of vertebrates*, *Enantiomer* **2**(1997)143-145
 - 13 FISHER G, et al. *Free D- and L-amino acids in ventricular cerebrospinal fluid from Alzheimer and normal subjects*, *Amino Acids*, **15**(1998)263-269
 - 14 WEBER DJ, et al. *Measurement of altered aspartyl residues in the scrapie associated form of prion protein*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**(1998)606-608
 - 15 BARBER JR, et al. *Membrane Protein Carboxyl Methylation Increases with Human Erythrocyte Age*, *J. Biol. Chem.* **258**(1983)1189-1196
 - 16 MCFADDEN PN, et al. *Methylation at D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**(1982)2460-2462
 - 17 CLARK S, et al. *Isolation of D-Aspartic Acid β -Methyl Ester from Erythrocyte Carboxyl Methylated Proteins*, *Methods in Enzymology*, **31**(1984)330-344
 - 18 FUJII N, et al. *D-Amino Acid Formation Induced by a Chiral Field within a Human Lens Protein during Aging*, *Biochem. Biophys. Res. Com.* **263**(1999)322-326
 - 19 GARAY AS, et al. *Nature*, **250**(1974)332
 - 20 HRASKÓ P, *KFKI Közlemények* (1973)40
 - 21 SOOS J, BAGYINKA CS, *Differential Beta-decay in Optical Isomers*, *Radiochem. Radioanal. Letters*, **27**(1976)169-174

-
- 22 CHARLES R, et al. J. Chrom. **112**(1975)121
 - 23 GIL-AV E, J. Mol. Biol. **6**(1975)131
 - 24 BADA JL, et al. A Search for Endogenous Amino Acids in Martian Meteorite ALH84001, Science, **279**(1998)362-365
 - 25 WILLIAMS KM, et al. *A Critical Evaluation of the Application of Amino Acid Racemization to Geochronology and Geothermometry*, Origins of Life **8**(1977)91-144
 - 26 OHTANI S, *Estimation of Age from the Teeth of Unidentified Corpses Using the Amino Acid Racemization Method with Reference to Actual Cases*, Am. J. Forensic. Med. Pathol. **16**(1995)238-242
 - 27 BADA JL, et al. Amino Acid Racemization Reactions and their Geochemical Implications, Naturwissenschaften, **62**(1975)71-79
 - 28 HO TY, Biochem, Biophys. Acta **133**(1967)568
 - 29 FOX SW, et al. J. Am. Chem. Soc. **82**(1960)3745
 - 30 TEMUSSI PA, et al. *Structural Characterisation of Thermal Prebiotic Polypeptides*, J. Mol. Evol. **7**(1976)105-110
 - 31 MELIUS P, *Structure of Thermal Polymers of Amino Acids*, Biosystems **15**(1982)275-280
 - 32 BONNER WA, et al. Origins of Life, **6**(1975)367
 - 33 SHIMOYAMA AS, et al. Origin of Life (2nd ISSOL Meeting, 1978)95
 - 34 AKIYAMA M, Origin of Life (2nd ISSOL Meeting, 1978)541
 - 35 FRONDEL C, Dana's the System of Mineralogy, 1962, 7th ed. III, 16
 - 36 FOX SW, *Metabolic Microspheres: Origins and Evolution*, Naturwissenschaften **67**(1980)378-383
 - 37 **SOÓS J**
Automatikus lineáris dikroizmus spektrométer
Szabadalmi Közlöny, **86**(1981)633 ... T/20681 (51) G01 J3/42 G01 N21/22(71)
...KÖZZÉTÉTEL
Szabadalmi Közlöny, **87**(1982)320 ... 178.288 (51) G01 J3/42 G01 N21/22(73)
...SZABADALOM
 - 38 NORDEN B, et al. *Linear Dichroism Spectroscopy as a Tool for Studying Molecular Orientation in Model Membrane Systems*, J. Phys. Chem. **81**(1977)2086-2093
 - 39 *Proceedings of the Nobel Workshop in Lund, October 25-27, 1976 on Molecular Optical Dichroism Spectroscopy and Chemical Applications of Polarized Spectroscopy* (Ed. B. Norden, Lund University Press, 1977)
 - 40 DAVIDSSON A, et al. Aspects on the Conversion of Legrand-Grosjean Circular Dichroism Spectrometers to Linear Dichroism Detection, Cernica Scripta **9**(1976)49-53
 - 41 HOPFINGER AJ, Currents in Modern Biology, **5**(1972)38
 - 42 FINKELSTEIN, AV, et al. J. Mol. Biol. **62**(1971)613

-
- 43 **SOOS J**
Microcomputer Prediction of Protein Structure from Amino Acid Sequence Data
9th International Biophysics Congress, IUPAB, Jerusalem, Israel, August 23-28, 1987
- 44 **UNGER R, et al.** *A 3D Building Blocks Approach to Analyzing and Predicting Structure of Proteins*, *PROTEINS: Structure, Function and Genetics* **5**(1989)355-373
- 45 **HODGMAN TC**, *The Elucidation of Protein Function by Sequence Motif Analysis*, *CABIOS* **5**(1989)1-13
- 46 **KABSCH W, et al.** *How Good Are Predictions of Protein Secondary Structure?* *FEBS Letters* **155**(1983)179-182
- 47 **KARPLUS K, et al.** *Predicting Protein Structure Using Only Sequence*, *Proteins*, **37**(1999)121-125
- 48 **ARGOS P, et al.** *Amino Acid Distribution in Protein Secondary Structures*, *Int. J. Peptide Res.* **19**(1982)380-393
- 49 **LACKNER P, et al.** *Automated Large Scale Evaluation of Protein Structure Predictions*, *Proteins* **37**(1999)7-14
- 50 **ROBSON B, et al.** *Refined Models for Computer Calculations in Protein Engineering, Calculation and Testing of Atomic Potential Functions Compatible with more Efficient Calculations*, *J. Mol. Biol.* **188**(1986)259-281
- 51 **CHOU PY, FASMAN GD**, *Prediction of the Secondary Structure of Proteins from Their Amino Acid Sequence*, *Adv. Enzymol.* **47**(1978)45-148
- 52 **ARGOS P, et al.** *The Chou-Fasman Secondary Structure Prediction Method with an Extended Data Base*, *FEBS Letters* **93**(1978)19-24
- 53 **GARNIER J, et al.** *Analysis of Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting the Secondary Structure of Globular Proteins*, *J. Mol. Biol.* **120**(1978)97-120
- 54 **BIOU V, et al.** *Secondary Structure Prediction: Combination of Three Different Methods*, *Protein Engineering* **2**(1988)185-191
- 55 **GIBRAT JF, et al.** *Further Dvelopments of Protein Secondary Structure Prediction Using Information Theory*, *J. Mol. Biol.* **198**(1987)425-443
- 56 **LEVIN JM, et al.** *Improvements in a Secondary Structure Prediction Method Based on a Search for Local Sequence Homologies and its Use as a Model Building Tool*, *Biochem. Biophys. Acta* **955**(1988)283-295
- 57 **KABSCH W, SANDER C**, *Biopolymers* **22**(1983)2577-2637
- 58 **BUSETTA B**, *Examination of Folding Patterns for Predicting Protein Topologies*, *Biochem. Biophys. Acta* **870**(1986)327-338
- 59 **LEVIN JM, et al.** *An Algorithm for Secondary Structure Determination in Proteins Based on Sequence Similarity*, *FEBS Letters* **205**(1986)303-308
- 60 **ROSE GD, ROY S**, *Hydrophobic Basis of Packing Globular Proteins*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**(1980)4643-4647
- 61 **EISENBERG D, et al.** *Hydrophobic Moments and Protein Structure*, *Faraday Symp. Chem. Soc.* **17**(1982)109-120

-
- 62 EISENBERG D, *Three-dimensional Structure of Membrane and Surface Proteins*, Ann. Rev. Biochem. **53**(1984)595-623
- 63 JONES DD, *Amino Acid Properties and Side-chain Orientation in Proteins: A Cross Correlation Approach*, J. Theor. Biol. **50**(1975)165-183
- 64 EISENBERG D, et al. J. Mol. Biol. **179**(1984)125-142
- 65 KYTE J, et al. J. Mol. Biol. **157**(1982)105-132
- 66 HOPP TP, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78**(1981)3824-3828
- 67 JONES DD, J. Theor Biol. **50**(1975)167-184)
- 68 SWEET RM, et al. J. Mol. Biol. **171**(1983)479-488
- 69 MANAVALAN P, et al. Nature **275**(1978)673-674
- 70 ABRAHAM DJ, et al. Proteins: Structure, Function and Genetics **2**(1987)130-152
- 71 BULL HB, et al. Arch. Biochem. Biophys. **161**(1974)665-670
- 72 FAUCHERE JL, et al. Eur. J. Med. Chem **18**(1983)369-375
- 73 GUY HR, Biophys. J. **47**(1985)61-70
- 74 MIYAZAWA S, et al. Macromolecules **18**(1985)534-552
- 75 ROSEMAN MA, J. Mol. Biol. **200**(1988)513-522
- 76 WILSON KJ, et al. Biochem J. **199**(1981)31-41
- 77 PARKER JMR, et al. Biochemistry **25**(1986)5425-5431
- 78 RAO MJK, et al. Biochim. Biophys. Acta **869**(1986)197-214
- 79 WOLFENDEN RV, et al. Biochemistry **20**(1981)849-855
- 80 WELLING GW, et al. FEBS Letters **188**(1985)215-218
- 81 ABODERIN AA, Int. J. Biochem. **2**(1971)537-544
- 82 JANIN J, Nature **277**(1979)491-492
- 83 CHOTIA C, J. Mol. Biol. **105**(1976)1-14
- 84 ROSE GD, et al. Science **229**(1985)834-838
- 85 DELEAGE G, ET AL. Protein Engineering **1**(1987)289-294
- 86 LEVITT M, Biochemistry **17**(1978)4277-4285
- 87 LIFSON S, et al. Nature **282**(1979)109-111
- 88 MCCALDON P, et al. Proteins: Structure, Function and Genetics **4**(1988)99-122
- 89 CLAVERIE JM, et al. Biochimie **67**(1985)437-443

-
- 90 BAUMANN G, et al. *Polarity as a Criterion in Protein Design*, Protein Engineering **2**(1989)329-334
- 91 SIEGEL JB, et al. *A Computer-Assisted Model for Estimating Protein Secondary Structure from Circular Dichroic Spectra: Comparison of Animal Lactate Dehydrogenases*, Anal. Biochem. **104**(1980)160-167
- 92 VRBJAR N, SOOS J, ZIEGELHOFFER
Secondary Structure of Heart Sarcolemmal Proteins During Interaction with Metallic Cofactors
Gen. Physiol. Biophys. **3**(1984)317-325
- 93 NORDEN B, *On the Calibration of Circular Dichroism Spectrometers*, Acta Chem. Scand. **27**(1973)4021-4024
- 94 VRBJAR N, ZIEGELHOFFER A, BREIER A, SOOS J, et al.
Quantitative Relationship Between the Protein Secondary Structure in Cardiac Sarcolemma and the Activity of the Membrane Bound Ca^{2+} -ATPase
Gen. Physiol. Biophys. **4**(1985)411-416
- 95 VRBJAR N, SOOS J, ZIEGELHOFFER
Magnesium-Dependent Conformational-Changes of Membrane-Proteins Are Related to the Mg^{2+} -Dependent ATPase Activity in Cardiac Sarcolemma
FEBS Lett **188**(1985)379-382
- 96 ROBSON B, *The Design of Biologically Active Polypeptides*, CRC Critical Reviews in Biochemistry **14**(4)273-296
- 97 SOOS J, BERZETEI I, BAJUSZ J and RONAI AZ
Correlation Between Circular Dichroism Data and Biological Activities of 2,5 Substituted Enkephalin Analogues
Life Sciences **27**(1980)129-133
- 98 NARVANEN A, KORKOLAINEN M, KONTIO S, SUNI J, TURTIANEN, PARTANEN P, SOOS J, VAHERI A, HUHTALA ML
Highly Immunoreactive Antigenic Site in a Hydrophobic Domain of HIV-1 gp41 which Remains Undetectable with Conventional Immunochemical Methods
AIDS **2**(1988)119-123
- 99 LIESI P, NARVANEN A, SOOS J, SARIOLA and SNOUNOU G
Identification of a Neurite Outgrowth-promoting Domain of Laminin Using Synthetic Peptides
FEBS Letters **244**(1989)141-148
- 100 BARLOW DP, et al. EMBO J. **3**(1984)2355-2362
- 101 SASAKI M, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**(1987)935-93

```

100 '...PROTEIN STRUCTURAL PREDICTION (v. 2.0)
101 '...PROGRAM BY J.SOOS, INST. OF BIOPHYSICS, BIOL. RES. CTR.
102 '...H-6701 SZEGED, P.O.B. 521, HUNGARY
110 DIM SEQ$(2000),TSS$(20),X(1),Y(1),Z(1),SI(1),CO(1),STD$(1),STD(26),SF(1,1)
120 FO$="STDATA.LST":QW$="OUTPUT.DAT":PR%=0
130 DEFINT I,J,K,L,N
140 KEY OFF
150 SCREEN 3
160 CLS:PRINT "HYDROPHOBIC MOMENT PLOT AND PARAMETER AVERAGING
(~hydroplot~)
170 PRINT:PRINT "1 Hydrophobic moment plot"
180 PRINT "2 Averaging"
190 PRINT "3 Read a sequence"
200 PRINT "4 Parameter/sequence list"
210 PRINT "5 Edmundson wheel/sheet"
220 PRINT "6 ";CHR$(230);"(deg)"
230 PRINT "7 Printer (":IF PR%=0 THEN PRINT "OFF":GOTO 250
240 PRINT "ON";
250 PRINT ")";
260 PRINT "8 Correlation coeffs."
270 PRINT "9 Folding probability"
280 PRINT "0 Chain flexibility"
290 PRINT ": Quit"
300 PRINT "*****SELECT (main): ";
310 ON ERROR GOTO 5990
320 AS=INKEY$:IF LEN (AS)=0 THEN 320
330 IF ASC(AS)<48 OR ASC(AS)>59 THEN 160
340 PRINT AS
350 ON (ASC(AS)-47) GOTO 2400,360,480,690,720,1020,1100,1160,1180,2190,2730
360 '...hydrophobic moment
370 GOSUB 5970
380 INPUT "RESIDUE/TURN ";RP:DEG=360/RP
390 FF%=1:GOSUB 2740 '...get the standard parameters
400 GOSUB 3930 'convert the sequence
410 '...looking for transmembrane segments
420 WIN%=21:ST%=1:EN%=N-20:GOSUB 2930
430 GOSUB 4000
440 WIN%=11:ST%=1:EN%=N-10:GOSUB 2930
450 GOSUB 3060:BEEP
460 GOSUB 4490
470 AS=INKEY$:IF LEN (AS)=0 THEN 470
480 '...AVERAGING
490 SCREEN 3
500 GOSUB 5970
510 PRINT "AVERAGING [";SN$;"] N= ";N
520 INPUT "Parameter no. ";FF%
530 INPUT "Window ";WIN%
540 WI%=(WIN%-1)/2
550 ST%=1:EN%=N-WIN%+1
560 GOSUB 2740
570 GOSUB 3930
580 GOSUB 2930
590 GOSUB 5150 ' min & max
600 PRINT "SET FOR PLOTTING":INPUT "min= ";MIN:INPUT "max= ";MAX

```

```

610 INPUT "Points from ";FROM$:INPUT "to ";TI$:INPUT "~zero~=" ;ZERO
620 IF TI%>(EN%) OR FROM%<1 OR FROM>TI% THEN PRINT "Out of range":GOTO 610
630 RANGE%=TI%-FROM%
640 IF RANGE%>600 THEN PRINT "Segment is too large to plot.":GOTO 610
650 BS="[" + SN$ + "]" AVERAGING (" + STR$(WIN%) + ") {" + LEFT$(NNS,15) + "}"
660 CS="X (" + STR$(FROM% + WI%) + " to " + STR$(TI% + WI%) + ") Y (" + STR$(MIN) + " to " + STR$(MAX) + ") ~zero line~ at " + STR$(ZERO)
670 CLS
680 GOSUB 5230
690 '..... read a sequence
700 GOSUB 3650
710 GOTO 300
720 '.....LIST.....
730 CLS:PRINT "1 Parameter list":PRINT "2 List of sequence names":PRINT "ELSE return to main menu":PRINT "***** SELECT ";
740 AS=INKEY$:IF LEN (AS)=0 THEN 740
750 IF ASC(AS)<49 OR ASC(AS)>50 THEN 160
760 PRINT ASC(AS)-48
770 ON ASC(AS)-48 GOTO 780,930
780 '...parameter list....
790 ERASE STD$:DIM STD$(26)
800 OPEN "R",#1,"STDATA.LST",164
810 FIELD #1,1 AS F$,54 AS N$
820 FOR I%=1 TO 26
830 FIELD #1,(51+4*I%) AS OFFSET$,4 AS STD$(I%)
840 NEXT I%
850 FOR CODE%=1 TO 100
860 GET #1,CODE%
870 IF F$<>CHR$(0) THEN 890
880 PRINT CODE%,N$:IF PR%=1 THEN LPRINT CODE%,N$
890 NEXT CODE%
900 CLOSE #1
910 ERASE STD$:DIM STD$(1)
920 GOTO 300
930 '.....directory.....
940 A=0
950 OPEN "T",1,"SEQUENCE.DAT"
960 WHILE NOT EOF(1)
970 LINE INPUT #1,SN$
980 IF LEFT$(SN$,1)="" THEN A=A+1:PRINT USING "### ";A:PRINT MIDS$(SN$,2):IF PR%=1 THEN LPRINT USING "### ";A:LPRINT MIDS$(SN$,2)
990 WEND
1000 CLOSE #1
1010 GOTO 300
1020 ' Edmundson
1030 GOSUB 5970
1040 FF%=1:GOSUB 2740:GOSUB 3930
1050 PRINT "Helix (H), sheet (S) or main menu? ";
1060 AS=INKEY$:IF LEN(AS)=0 THEN 1060
1070 IF AS="H" OR AS="h" THEN GOSUB 5460:GOTO 1050
1080 IF AS="S" OR AS="s" THEN GOSUB 5590:GOTO 1050
1090 GOTO 160
1100 ' Moment & angle dep.
1110 GOSUB 5970

```



```

1120 PRINT "Hydrophobic moment calc. in 10 degrees res. (80-180)"
1130 INPUT "Window= ",WIN%
1140 FF%=1:GOSUB 2740:GOSUB 3930:GOSUB 5760
1150 LOCATE 23,1:PRINT SN$,"[WINDOW= ";WIN%;"]":KEY (1) ON:KEY (2) ON:GOTO 5420
1160 IF PR%=0 THEN PR%=1 ELSE PR%=0
1170 GOTO 160
1180 '...Correlation coeffs.
1190 RESTORE 1200
1200 DATA 10,6,7,12,13,14,15,16,17,18,19
1210 READ MN%:ERASE SI:DIM SI(MN%)
1220 FOR I=1 TO MN%:READ SI(I):NEXT I
1230 CLS
1240 PRINT " CORRELATION COEFS."
1250 PRINT "1 Parameter set (N=";MN%;") p: ";FOR I=1 TO MN%:PRINT SI(I);NEXT I:PRINT
1260 PRINT "2 File specification [";QW$;"] (content cleared by 3 & 4)
1270 PRINT "3 Autocorrelation"
1280 PRINT "4 Crosscorrelation"
1290 PRINT "5 Plot from the specified file"
1300 PRINT "6 Main menu"
1310 PRINT "*****SELECT (cor.coefs.) ";
1320 AS=INKEY$:IF LEN(AS)=0 THEN 1320
1330 A%=ASC(AS)-48:IF A%<1 OR A%>6 THEN 1230
1340 PRINT A%:DATIM$=DATES+" "+TIMES
1350 ON A% GOTO 1360,1400,1430,1570,1730,300
1360 ' parameter set
1370 INPUT "How many parameters ";MN%
1380 ERASE SI:DIM SI(MN%)
1390 FOR I=1 TO MN%:PRINT I;INPUT SI(I):NEXT I:GOTO 1310
1400 ' file spec.
1410 INPUT "Drive, dir, file: ",QW$
1420 GOTO 1310
1430 ' autocor
1440 GOSUB 3650 ' seq. read
1450 INPUT "Lags: ",L
1460 ERASE X,Y:DIM X(N),Y(L-1)
1470 OPEN "O",4,QW$
1480 PRINT #4,"AUTOCORRELATION":PRINT #4,SN$:PRINT #4,MN%:PRINT #4,L
1490 FOR P%=1 TO MN%:FF%=SI(P%):PRINT #4,FF%:NEXT P%
1500 FOR P%=1 TO MN%:FF%=SI(P%)
1510 GOSUB 2740 ' std. data read
1520 GOSUB 3930 ' seq. conv.
1530 GOSUB 3270 ' autocor
1540 IF Y(0)=0 THEN PRINT "ERROR":GOTO 1310
1550 FOR J=1 TO L-1:PRINT #4,Y(J):NEXT J
1560 NEXT P%:CLOSE #4:BEEP:PRINT "Ready: ",DATIM$," - ";DATES," ";TIMES:GOTO 1310
1570 '...Crosscor
1580 INPUT "Shorter sequence number: ",SHORT%
1590 INPUT "Longer sequence number: ",LONG%
1600 I=SHORT%:GOSUB 3690:SSN$=SN$:M=N
1610 I=LONG%:GOSUB 3690
1620 L=N-M+1
1630 ERASE Y,Z:DIM Y(L-1),Z(M)
1640 OPEN "O",4,QW$

```

```

1650 PRINT #4,"CROSSCORRELATION":PRINT #4,SN$+" & " +SSN$:PRINT #4,MN%:PRINT #4,L
1660 FOR O%=1 TO MN%:FF%=SI(O%):PRINT #4,FF%:NEXT O%
1670 FOR O%=1 TO MN%:FF%=SI(O%):GOSUB 2740
1680 I=SHORT%:GOSUB 3690:ERASE X:DIM X(N):GOSUB 3930:FOR P%=1 TO N:Z(P%)=X(P%):NEXT P%
1690 I=LONG%:GOSUB 3690:ERASE X:DIM X(N):GOSUB 3930
1700 GOSUB 3470:IF Y(0)=0 THEN PRINT "ERROR":GOTO 1310
1710 FOR P%=1 TO L-1:PRINT #4,Y(P%):NEXT P%
1720 NEXT O%:CLOSE #4:BEEP:PRINT "Ready: ",DATES,TIMES:GOTO 1310
1730 ' Corr.coef. plot from file
1740 OPEN "I",4,QW$
1750 INPUT #4,TYPE$:INPUT #4,SN$:INPUT #4,MN%:INPUT #4,L
1760 ERASE SI:DIM SI(MN%)
1770 FOR I=1 TO MN%:INPUT #4,SI(I):NEXT I
1780 PRINT "File: ";QW$:PRINT "Type: ";TYPE$, "Sequence(s): ";SN$:PRINT "Data for ";MN%,"
different parameters.":PRINT "The corresponding numbers in the ~STDATA.LST~ file are: ";FOR
I=1 TO MN%:PRINT SI(I);NEXT I:PRINT
1790 PRINT :PRINT " PLOT":PRINT "1 One function":PRINT "2 Average":PRINT "3 Menu
(cor.coefs.)"
1800 PRINT "*****SELECT (plot) ";
1810 AS=INKEY$:IF LEN(AS)=0 THEN 1810
1820 A%=ASC(AS)-48:IF A%<1 OR A%>3 THEN BEEP:GOTO 1810:ELSE PRINT A%
1830 ON A% GOTO 1840,1900,1310
1840 INPUT "No. ",NO%
1850 ERASE Y:DIM Y(L-1):PAR$=STR$(NO%)
1860 FOR I=1 TO MN%:IF NO%=SI(I) THEN FOR P%=1 TO L-1:INPUT #4,Y(P%):NEXT
P%:CLOSE #4:GOTO 2090
1870 FOR P%=1 TO L-1:INPUT #4,Q: NEXT P%
1880 NEXT I
1890 PRINT "No corresponding data found (p: ";NO%;").":CLOSE #4:GOTO 1740
1900 PRINT "Average of all (A) or several (S) results? ";
1910 AS=INKEY$:IF LEN(AS)=0 THEN 1910
1920 IF AS="A" OR AS="a" THEN 2060
1930 IF AS="S" OR AS="s" THEN 1950
1940 BEEP:GOTO 1800
1950 PRINT AS:INPUT "How many parameters? ",MMN%:PRINT "Type the parameter numbers (in
sequence!)"
1960 IF MMN%>MN% THEN 1940
1970 ERASE CO:DIM CO(MMN%):PAR$="":FOR I=1 TO MMN%:PRINT I;INPUT
CO(I):PAR$=PAR$+" "+STR$(CO(I)):NEXT I
1980 ERASE Y:DIM Y(L-1)
1990 FOR I=1 TO MMN%
2000 FOR J=I TO MN%:IF CO(I)=SI(J) THEN FOR II=1 TO L-1:INPUT
#4,Q:Y(II)=Y(II)+Q:NEXT II:GOTO 2030
2010 FOR II=1 TO L-1:INPUT #4,Q:NEXT II
2020 NEXT J:PRINT "No corresponding data found (p: ";CO(I);").":CLOSE #4:GOTO 1740
2030 NEXT I
2040 FOR I=1 TO L-1:Y(I)=Y(I)/MMN%:NEXT I
2050 CLOSE #4:GOTO 2090
2060 PRINT AS:ERASE Y:DIM Y(L-1):PAR$=""
2070 FOR I=1 TO MN%:PAR$=PAR$+" "+STR$(SI(I)):FOR J=1 TO L-1:INPUT
#4,Q:Y(J)=Y(J)+Q:NEXT J:NEXT I
2080 FOR I=1 TO L-1:Y(I)=Y(I)/MN%:NEXT I:CLOSE #4

```

```

2090 ST%=1:EN%=L-1:GOSUB 5150:Y(0)=1
2100 PRINT "SET FOR PLOTTING":INPUT "min= ";MIN:INPUT "max= ";MAX
2110 INPUT "Points from ",FROM%:INPUT "to ",TI%:ZERO=0
2120 IF TI%>EN% OR FROM%<0 OR FROM%>TI% THEN PRINT "Out of range":GOTO 2110
2130 RANGE%=TI%-FROM%
2140 BS="[" + SN$ + "]" + TYPE$
2150 CS="X (" + STR$(FROM%) + " to " + STR$(TI%) + ") {lags} Y (" + STR$(MIN) + " to " + STR$(MAX) + ")"
2160 CLS
2170 LOCATE 22,5:PRINT "p";PAR$;
2180 GOSUB 5230
2190 '.....Folding
2200 GOSUB 5970
2210 ERASE X,Y,SI,CO
2220 DIM Y(N-3),X(26),SI(26),CO(26)
2230 FF%=8:GOSUB 2740:FOR I=1 TO 26:X(I)=STD(I):NEXT I ' (I)
2240 FF%=9:GOSUB 2740:FOR I=1 TO 26:SI(I)=STD(I):NEXT I ' (I+1)
2250 FF%=10:GOSUB 2740:FOR I=1 TO 26:CO(I)=STD(I):NEXT I ' (I+2)
2260 FF%=11:GOSUB 2740 ' (I+3)
2270 FOR I=1 TO N-3
2280 Y(I)=X(ASC(SEQ$(I))-64)*SI(ASC(SEQ$(I+1))-64)*CO(ASC(SEQ$(I+2))-64)*STD(ASC(SEQ$(I+3))-64)
2290 NEXT I
2300 ST%=1:EN%=N-3:GOSUB 5150
2310 PRINT "SET FOR PLOTTING":INPUT "min= ";MIN:INPUT "max= ";MAX
2320 INPUT "Points from ",FROM%:INPUT "to ",TI%:ZERO=.00005
2330 IF TI%>(EN%) OR FROM%<1 OR FROM%>TI% THEN PRINT "Out of range":GOTO 2320
2340 RANGE%=TI%-FROM%
2350 IF RANGE%>600 THEN PRINT "Segment is too large to plot.":GOTO 2320
2360 BS="[" + SN$ + "]" FOLDING PROBABILITY"
2370 CS="X (" + STR$(FROM%) + " to " + STR$(TI%) + ") Y (" + STR$(MIN) + " to " + STR$(MAX) + ") threshold: " + STR$(ZERO)
2380 CLS
2390 GOSUB 5230
2400 '.....CHAIN FLEXIBILITY.....
2410 GOSUB 5970
2420 FF%=23:GOSUB 2740:GOSUB 3930 ' seq. conv. (rigid/flexible)
2430 ERASE CO,SF:DIM CO(7),SF(2,26)
2440 RESTORE 2450
2450 DATA .25,.5,.75,1,.75,.5,.25
2460 FOR I%=1 TO 7:READ CO(I%):NEXT I%
2470 FOR IG%=0 TO 2
2480 FF%=20+IG%:GOSUB 2740
2490 FOR I%=1 TO 26:SF(IG%,I%)=STD(I%):NEXT I%
2500 NEXT IG%
2510 FOR I%=2 TO N%-1
2520 IG%=X(I%-1)+X(I%+1)
2530 X(I%-1)=SF(IG%,ASC(SEQ$(I%))-64)
2540 NEXT I%
2550 ERASE Y:DIM Y(N%-5)
2560 FOR I%=0 TO N%-9
2570 PRED=0
2580 FOR J%=1 TO 7
2590 PRED=PRED+X(I%+J%)*CO(J%)

```

```

2600 NEXT J%
2610 Y(I%+1)=PRED/4
2620 NEXT I%
2630 ST%=1:EN%=N%-8:GOSUB 5150
2640 PRINT "SET FOR PLOTTING":INPUT "min= ";MIN:INPUT "max= ";MAX
2650 INPUT "Points from ",FROM%:INPUT "to ",TI%:ZERO=1
2660 IF TI%>(EN%) OR FROM%<1 OR FROM%>TI% THEN PRINT "Out of range":GOTO 2650
2670 RANGE%=TI%-FROM%
2680 IF RANGE%>600 THEN PRINT "Segment is too large to plot.":GOTO 2650
2690 BS="[" + SN$ + "]" (C"+CHR$(224)+") CHAIN FLEXIBILITY"
2700 CS="X (" + STR$(FROM%+4)+ " to " + STR$(TI%+3)+ ") Y (" + STR$(MIN) + " to " + STR$(MAX) + ") ~zero line~ at " + STR$(ZERO)
2710 CLS
2720 GOSUB 5230
2730 KEY ON:CLOSE:END
2740 '.....STANDARD DATA TO STD(26).....
2750 ' file specification in FO$ (default = A:STDATA.LST), subfile code = FF%
2760 ' data return in STD(26) & N$ holds the name and comment
2770 ' STD$(1) & STD(26) should be dimensioned in the main program
2780 ' [ value = STD(ASC(AA-code)-64) ]
2790 IF FO$<>" " THEN FF$=FO$ ELSE FF$="A:STDATA.LST"
2800 ERASE STD$:DIM STD$(26)
2810 OPEN "R",#1,FF$,164
2820 FIELD #1,1 AS F$,54 AS N$
2830 FOR I%=1 TO 26
2840 FIELD #1,(51+4*I%) AS OFFSET$,4 AS STD$(I%)
2850 NEXT I%
2860 GET #1,FF%
2870 IF F$<>CHR$(0) THEN PRINT "EMPTY SUBFILE.":GOTO 300
2880 NN$=N$:PRINT N$
2890 FOR I%=1 TO 26:STD(I%)=CVS(STD$(I%)):NEXT I%
2900 ERASE STD$:DIM STD$(1)
2910 CLOSE #1
2920 RETURN
2930 '.....SUBROUTINE AVERAGING.....
2940 ' numerical vector X(N), result returns in Y(N-WIN+1), N=res. number
2950 ' WIN%=averaging group length, ST%= start [min=1]
2960 ' EN%=end [max=N-WIN%+1]
2970 ERASE Y:DIM Y(N-WIN%+1)
2980 FOR I%=ST% TO EN%
2990 SUM=0
3000 FOR J%=I% TO I%+WIN%-1
3010 SUM=SUM+X(J%)
3020 NEXT J%
3030 Y(I%)=SUM/WIN%
3040 NEXT I%
3050 RETURN
3060 '.....SUBROUTINE HYDROMOM.....
3070 ' numerical vector X(N%), result returns in Z(), N=res.number
3080 ' WIN%=segment length, ST%= start, EN%= end, DEG=degree (in deg)
3090 ERASE Z,SI,CO:DIM Z(EN%-ST%+1),SI(WIN%),CO(WIN%)
3100 RAD=DEG*.017453293#
3110 FOR I%=1 TO WIN%
3120 DN=RAD*I%

```

```

3130 SI(I%)=SIN(DN)
3140 CO(I%)=COS(DN)
3150 NEXT I%
3160 FOR I%=ST% TO EN%
3170 SS=0:CC=0
3180 FOR J%=1 TO WIN%
3190 IL%=I%-1+J
3200 SS=SS+X(IL%)*SI(J%)
3210 CC=CC+X(IL%)*CO(J%)
3220 NEXT J%
3230 SS=SS^2:CC=CC^2
3240 Z(I%)=SQR(SS+CC)/WIN%
3250 NEXT I%
3260 RETURN
3270 '.....SUBROUTINE AUTOCOR.....
3280 'data from X(N), result goes to Y(L-1), L<N, autocovariances are calculated
3290 'for lags 0,1,2,...(L-1)
3300 IF N<=L THEN PRINT "N<=L in ~AUTOCOR~":Y(0)=0:RETURN
3310 FOR T%=0 TO (L-1)
3320 X1=0:X2=0:X3=0:X4=0:X5=0
3330 FOR I=1 TO (N-T%)
3340 X1=X1+X(I):X2=X2+X(I+T%)
3350 NEXT I
3360 X1=X1/(N-T%):X2=X2/(N-T%)
3370 FOR I=1 TO (N-T%)
3380 X3=X3+(X(I)-X1)*(X(I+T%)-X2)
3390 POW=X(I)-X1
3400 X4=X4+POW^2
3410 POW=X(I+T%)-X2
3420 X5=X5+POW^2
3430 NEXT I
3440 Y(T%)=X3/SQR(X4*X5)
3450 NEXT T%
3460 RETURN
3470 '.....SUBROUTINE CROSSCOR.....
3480 'data from X(N) and Z(M), result goes to Y(L-1), L<N
3490 'crosscovariance is calculated for lags of 0,1,2,...(L-1)
3500 IF N<=L THEN PRINT "N<=L in ~CROSSCOR~":Y(0)=0:RETURN
3510 FOR T%=0 TO (L-1)
3520 X0=0:X1=0:X2=0:Y1=0:Y2=0
3530 FOR B%=1 TO M
3540 I=T%+B%-1
3550 X0=X0+X(I)*Z(B%)
3560 X1=X1+X(I)
3570 X2=X2+X(I)^2
3580 Y1=Y1+Z(B%)
3590 Y2=Y2+Z(B%)^2
3600 NEXT B%
3610 RES=(M*X2-X1^2)*(M*Y2-Y1^2)
3620 Y(T%)=(M*X0-X1*Y1)/SQR(RES)
3630 NEXT T%
3640 RETURN
3650 '.....SUBROUTINE SEQREAD.....
3660 'SEQ$(2000) AND TSS(20) should be dimensioned, reads a sequence by number

```

```

3670 'from ~SEQUENCE.DAT~ (sequential) file. Residue number returns in N.
3680 INPUT "Enter sequence number to read: ",I
3690 OPEN "I",#1,"SEQUENCE.DAT"
3700 J=0
3710 WHILE NOT EOF(1)
3720 LINE INPUT #1,T$
3730 IF LEFT$(T$,1)="" THEN J=J+1
3740 IF J=1 THEN SN$=MID$(T$,2):GOTO 3790
3750 WEND
3760 CLOSE #1
3770 INPUT "File not found. Another trial ";A$
3780 IF A$="Y" OR A$="Y" THEN 3680 ELSE END
3790 LINE INPUT #1,COMMS
3800 I=1
3810 LINE INPUT #1,TSS(I)
3820 IF RIGHT$(TSS(I),1)<>"." THEN I=I+1:GOTO 3810
3830 CLOSE #1
3840 I=1:K=0
3850 FOR J=1 TO LEN(TSS(I))
3860 K=K+1
3870 SEQ$(K)=MID$(TSS(I),J,1)
3880 NEXT J
3890 IF RIGHT$(TSS(I),1)<>"." THEN I=I+1:GOTO 3850
3900 N=K-1
3910 PRINT "[",SN$,"] N=";N
3920 RETURN
3930 '.....SEQUENCE CONVERSION.....
3940 'data from SEQ$(2000), values to X(N)
3950 ERASE X:DIM X(N)
3960 FOR I=1 TO N
3970 X(I)=STD(ASC(SEQ$(I))-64)
3980 NEXT I
3990 RETURN
4000 '...locating transmembrane candidates
4010 NN=N-WIN%+1
4020 NI=0 ' count value(s) over 0.42
4030 FOR I=1 TO NN
4040 IF Y(I)>.42 THEN NI=NI+1
4050 NEXT I
4060 IF NI=0 THEN 4470
4070 '
4080 ERASE SI,CO:DIM SI(NI),CO(NI) ' SI() = value(s) over 0.42, CO() = location
4090 II=0
4100 FOR I=1 TO NN
4110 IF Y(I)>.42 THEN II=II+1:SI(II)=Y(I):CO(II)=I ' fill SI() & CO()
4120 NEXT I
4130 IF NI=1 AND SI(1)<.68 THEN 4470
4140 IF NI=1 THEN PRINT "One transmembrane candidate: ";CO(1);"-";CO(1)+20:GOTO 4480
4150 IF NI=2 AND (SI(1)+SI(2))<1.1 THEN 4470
4160 '
4170 FOR I=1 TO NI-1 ' order by MAX
4180 FOR J=1 TO NI
4190 IF SI(I)<SI(J) THEN SWAP SI(I),SI(J):SWAP CO(I),CO(J)
4200 NEXT J

```



```

4210 NEXT I
4220 '
4230 FOR I=1 TO NI-1      ' looking for overlapping values
4240 IF CO(I)=0 THEN 4400  ' already cleared
4250 FOR J=I+1 TO NI
4260 IF CO(J)=0 THEN 4380
4270 IF ABS(CO(I)-CO(J))>20 THEN 4380 ' no overl.
4280 IF SI(I)>SI(J) THEN 4370 ' different values
4290 K=0 ' equal overlapping values
4300 K=K+1:I1=CO(I)-K:I2=CO(I)+K ' ? values around CO(I) & CO(J)
4310 J1=CO(J)-K:J2=CO(J)+K
4320 IF I1=0 THEN 4390
4330 IF J2=NI+1 THEN 4370
4340 SUMI=Y(I1)+Y(I2):SUMJ=Y(J1)+Y(J2)
4350 IF SUMI=SUMJ THEN 4300
4360 IF SUMI<SUMJ THEN 4390 ELSE 4370
4370 SI(J)=0:CO(J)=0
4380 NEXT J:GOTO 4400
4390 SI(I)=0:CO(I)=0
4400 NEXT I
4410 CLS:PRINT SNS:PRINT "Transmembrane candidates:":PRINT:IF PR%=1 THEN
LPRINT:LPRINT SNS:LPRINT "Transmembrane candidates:":LPRINT
4420 FOR I=1 TO NI
4430 IF CO(I)<>0 THEN PRINT USING " #### ";CO(I):FOR J=CO(I) TO CO(I)+21:PRINT
SEQ$(J):NEXT J:PRINT USING " ####";CO(I)+20:PRINT USING " [###.###]";SI(I):ELSE
4450
4440 IF PR%=1 THEN LPRINT USING " #### ";CO(I):FOR J=CO(I) TO CO(I)+21:LPRINT
SEQ$(J):NEXT J:LPRINT USING " ####";CO(I)+20:LPRINT USING " [###.###]";SI(I)
4450 NEXT I:PRINT:IF PR%=1 THEN LPRINT
4460 GOTO 4480
4470 PRINT "No transmembrane segment."
4480 BEEP:RETURN
4490 '... SUBROUTINE PLOT
4500 CLS:PRINT "HYDROPHOBIC MOMENT PLOT":PRINT "1 all points plotted":PRINT "2
points one by one (move left= ";CHR$(27);", right= ";CHR$(26);")":PRINT "3 main menu":PRINT
"When picture is on the screen: F1= get this menu, F2= get a hardcopy"
4510 PRINT "*****SELECT (hymom) ";
4520 A$=INKEY$:IF LEN (A$)=0 THEN 4520
4530 A=ASC(A$)-48:IF A<1 OR A>3 THEN 4500 ELSE PRINT A$
4540 IF A=3 GOTO 160
4550 KEY OFF
4560 SCREEN 3
4570 IF A=2 THEN 4700
4580 PRINT "Select segment to plot (can be 1-";N-10;")":INPUT "FROM ";FROM:INPUT "TO ";TI
4590 IF FROM<1 OR TI>(N-10) OR FROM>(N-10) THEN BEEP:GOTO 4580
4600 GOSUB 4980
4610 FOR I=40 TO 540 STEP 100:LINE (I,330)-STEP(0,300):NEXT I
4620 FOR I=30 TO 330 STEP 60:LINE (540,I)-STEP(-500,0):NEXT I
4630 FOR I=FROM TO TI:X=40+(Y(I)+1)*200:Y=330-Z(I)*200:PSET (X,Y):NEXT I
4640 LOCATE 24,5:PRINT "Points from ";FROM;" to ";TI:".";
4650 KEY (1) ON:KEY (2) ON
4660 ON KEY (1) GOSUB 4820
4670 ON KEY (2) GOSUB 4850
4680 GOTO 4660

```

```

4690 LOCATE 23,5:PRINT "Points from ";FROM;" to ";TI:".";
4700 ' one by one
4710 GOSUB 4980
4720 FOR I=40 TO 540 STEP 100:LINE (I,330)-STEP(0,3):LINE (I,30)-STEP(0,-3):NEXT I
4730 FOR I=30 TO 330 STEP 60:LINE (540,I)-STEP(3,0):LINE (40,I)-STEP(-3,0):NEXT I
4740 I=1
4750 GOSUB 5060
4760 KEY (12) ON:KEY (13) ON:KEY (1) ON:KEY (2) ON
4770 ON KEY (12) GOSUB 4880
4780 ON KEY (13) GOSUB 4930
4790 ON KEY (1) GOSUB 4820
4800 ON KEY (2) GOSUB 4850
4810 GOTO 4770
4820 ' key (1)
4830 KEY (1) OFF:KEY (2) OFF:KEY (12) OFF:KEY (13) OFF:GOTO 4500
4840 RETURN
4850 ' key (2)
4860 LCOPY
4870 RETURN
4880 ' key (12), move left
4890 IF I-1<1 THEN BEEP:RETURN
4900 PSET (X,Y),0:I=I-1
4910 GOSUB 5060
4920 RETURN
4930 ' key (13), move right
4940 IF I+1>N-10 THEN BEEP:RETURN
4950 PSET (X,Y),0:I=I+1
4960 GOSUB 5060
4970 RETURN
4980 '...coords.
4990 X1=40:X2=540:Y1=30:Y2=330
5000 CLS:PRINT TAB(5);SNS:TAB(45);"HYDROPHOBIC MOMENT PLOT"
5010 LINE (X1,Y1)-(X2,Y2),B
5020 KEY OFF:KEY (1) ON:KEY (2) ON
5030 LOCATE 22:PRINT " -1.0          0.0          1.0          <H>"
5040 LOCATE 3:PRINT "<";CHR$(230);">":LOCATE 6:PRINT "1.0":LOCATE 14:PRINT
"0.5":LOCATE 21:PRINT "0.0"
5050 RETURN
5060 ' ...plot one dot & specify
5070 X=40+(Y(I)+1)*200:Y=330-Z(I)*200:PSET (X,Y)
5080 LOCATE 23,1:PRINT USING " #### ";I:FOR J=I TO I+10:PRINT SEQ$(J):NEXT J
5090 PRINT USING " #### ";I+10:PRINT " [<H>=" ";PRINT USING
"+###.###";Y(I):PRINT " <";CHR$(230);">=" ";PRINT USING "###.###";Z(I):PRINT "]"
5100 B$="":IF Z(I)>(.6-.342*Y(I)) THEN B$=B$+"SURFACE":GOTO 5130
5110 IF Y(I)<=.51 THEN B$=B$+"GLOBULAR":GOTO 5130
5120 B$=B$+"TRANSMEMBRANE ":IF Z(I)>(.603*Y(I)-.392) THEN
B$=B$+"(multimeric)":ELSE B$=B$+"(monomeric)"
5130 LOCATE 24,5:PRINT "Type: ";PRINT USING "\          \";B$;
5140 RETURN
5150 ' ...YMAX, YMIN det. (in Y()), from ST% to EN% - should be setted)
5160 YMAX=Y(I):YMIN=Y(I):MALO%=1:MILO%=1
5170 FOR I=ST% TO EN%
5180 IF YMAX<Y(I) THEN YMAX=Y(I):MALO%=I
5190 IF YMIN>Y(I) THEN YMIN=Y(I):MILO%=I

```

```

5200 NEXT I
5210 PRINT "Ymin= ";YMIN;" at ";MILO%:PRINT "Ymax= ";YMAX;" at ";MALO%:PRINT
"Length= ";EN%
5220 RETURN
5230 '...average plot
5240 KEY (1) ON:KEY (2) ON
5250 IF RANGE%>300 THEN STE%=1:GOTO 5280
5260 IF RANGE%>200 THEN STE%=2:GOTO 5280
5270 STE%=3
5280 X1=39:X2=639:Y1=0:Y2=299
5290 LINE (X1,Y1)-(X2,Y2),B
5300 FOR I=40 TO 639 STEP 30:LINE (I,300)-STEP(0,3):LINE (I,0)-STEP(0,1):NEXT I
5310 FOR I=0 TO 299 STEP 30:LINE (638,I)-STEP(-1,0):LINE (39,I)-STEP(-3,0):NEXT I
5320 KEY OFF:LOCATE 2,72:PRINT "I";600/STE%;" ";
5330 LOCATE 20,5
5340 PRINT BS
5350 PRINT TAB(5);CS
5360 SCALE=(MAX-MIN)/300
5370 FOR I=1 TO RANGE%
5380 X1%=40+(I-1)*STE%:Y1%=((Y(I+FROM%-1)-MIN)/SCALE):Y2%=(Y(I+FROM%-1)-
Y(I+FROM%))/SCALE
5390 LINE (X1%,300-Y1%)-STEP(STE%,Y2%)
5400 NEXT I
5410 IF MIN<ZERO AND MAX>ZERO THEN LINE (40,300-(ZERO-MIN)/SCALE)-
STEP(599,0)
5420 ON KEY (1) GOSUB 5450
5430 ON KEY (2) GOSUB 4850
5440 GOTO 5420
5450 KEY (1) OFF:KEY (2) OFF:GOTO 160
5460 '...WHEEL
5470 INPUT "Helix starts at ",WHEEL%
5480 IF WHEEL%>N-17 THEN 5580
5490 WHEEL%=WHEEL%-1
5500 CLS
5510 FOR M=0 TO 85 STEP 5:A=3.14*M/9:WHEEL%=WHEEL%+1:X=INT
(28.5+18*SIN(A)):Y=INT (12.5-8*COS(A)):LOCATE Y,X:IF X(WHEEL%)>.12 THEN COLOR
0,1,0
5520 PRINT SEQ$(WHEEL%);
5530 COLOR 1,0,1
5540 X=INT (26.5+21*SIN(A)):Y=INT (12.5-10*COS(A)):LOCATE Y,X:PRINT WHEEL%:NEXT
M
5550 COLOR 1,0,1
5560 LOCATE 23,1:PRINT SNS
5570 IF PR%=1 THEN LCOPY
5580 RETURN
5590 '...SHEET
5600 INPUT "Sheet starts at ",SHEET%
5610 CLS
5620 IF SHEET%>N-17 THEN 5750
5630 SHEET%=SHEET%-1
5640 FOR K=1 TO 18 STEP 2
5650 I=K*4:FOR J=5 TO 8 STEP 3:LOCATE J,I:SHEET%=SHEET%+1
5660 IF X(SHEET%)>.12 THEN COLOR 0,1,0
5670 PRINT SEQ$(SHEET%)

```

```

5680 COLOR 1,0,1
5690 IF J=5 THEN LOCATE (J-1),(I-2) ELSE LOCATE (J+1),(I-2)
5700 PRINT SHEET%:I=(K+1)*4
5710 NEXT J
5720 NEXT K
5730 LOCATE 23,1:PRINT SNS
5740 IF PR%=1 THEN LCOPY
5750 RETURN
5760 '...FOURIER
5770 KEY OFF:SCREEN 3
5780 CLS
5790 FOR I=10 TO N-WIN%+1 STEP 10:LINE (I,339)-STEP(0,-4):NEXT I
5800 J=190:FOR I=1 TO 21 STEP 2:LOCATE I,75:J=J-10:PRINT USING "###";J:NEXT I
5810 FOR K=1 TO N-WIN%+1
5820 X=0
5830 FOR I=80 TO 180 STEP 10
5840 X=X+1:D=I*.017453293#
5850 Z=0:BS=0:BC=0
5860 FOR J=K TO K+WIN%-1
5870 Z=Z+1:G=D*Z
5880 BS=BS+X(J)*SIN(G)
5890 BC=BC+X(J)*COS(G)
5900 NEXT J
5910 DX=SQR(BS^2+BC^2)/WIN%
5920 LINE (K,330-(I-80)*3)-STEP(0,-22*DX)
5930 NEXT I
5940 NEXT K
5950 IF PR%=1 THEN LCOPY
5960 RETURN
5970 IF N=0 THEN PRINT "No sequence in the memory.":GOTO 300
5980 RETURN
5990 CLOSE:PRINT "ERROR! CODE= ";ERR:BEEP:GOTO 300

```